

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**INTEGRAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *LTB-R1* EM PLANTAS
DE TABACO**

Gabriel Baracy Klafke

Pelotas, março de 2010.

GABRIEL BARACY KLAFKE

INTEGRAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *LTB-R1* EM PLANTAS DE TABACO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.Sc.) (área do conhecimento: Biotecnologia Vegetal).

Orientação:

Prof. Dr. José Antonio Peters (UFPel)

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Valmor João Bianchi (UFPel)

Dr^a. Fabiana Roos Nora (UFPel)

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Peters (orientador)

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (UFPel)

Prof. Dr. Leonardo Ferreira Dutra (EMBRAPA)

Prof. Dr^a. Luciana Bicca Dode (UFPel)

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente.

Em especial, ao amigo e orientador José Antonio Peters e a companheira de laboratório Fabiana Roos Nora, pela confiança, ensinamentos e apoio.

Aos meus pais, minha família e ao amigo Juliano pelo apoio.

À namorada Daniele e sua família, pela compreensão e incentivo.

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas Marcelo, Wallace, Rodrigo, Gabriel, Jairo, Roberta e prof^a. Luciana Bicca pela ajuda, companheirismo e paciência durante a realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Centro de Biotecnologia.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização direta ou indireta deste trabalho.

RESUMO

KLAFKE, Gabriel Baracy. **Integração e expressão do gene *Itb-r1* em plantas de tabaco**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas tornou-se uma realidade consolidada. Nesse sentido, utilizando-se da engenharia genética, é possível obter plantas servindo como biorreatores na produção de tecidos ou órgãos expressando antígenos que podem ser facilmente utilizados como vacina. Os sistemas de expressão em plantas como tomate, alface, tabaco que servem como modelos desse processo, apresentam várias vantagens, entre elas, a conservação da maquinaria eucariótica que promove as modificações pós-traducionais das proteínas e ainda a possibilidade de produção em larga escala. Dentro desta estratégia de produção de proteínas, pode-se citar a pneumonia micoplásmica suína (PMS), causada pelo agente *Mycoplasma hyopneumoniae*, uma das principais doenças de suínos que provoca elevadas perdas econômicas em todo mundo, e tem, na tecnologia do DNA recombinante, uma alternativa de desenvolvimento de vacinas mais efetivas. O objetivo do trabalho foi transformar plantas de tabaco para sua utilização como biorreator na produção de um antígeno vacinal contra a PMS. Folhas e entrenós foram cultivados em diferentes concentrações de BAP e AIA. As melhores taxas de regeneração foram encontradas utilizando 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA para segmentos de folhas e entrenós. O teste de seleção utilizando canamicina mostrou-se altamente eficiente, obtendo-se a supressão da regeneração com 30 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ para segmentos de folhas e entrenós, respectivamente. Colônias recombinantes de *A. tumefaciens* contendo *Itb-r1* foram co-cultivadas com entrenós e segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*. Após esta etapa, os explantes foram transferidos para meios de seleção, visando selecionar células possivelmente transformadas. O DNA genômico das plantas regeneradas e putativamente transformadas foi extraído e amplificado por PCR, na qual foi possível visualizar uma banda referente ao *Itb-r1*. A detecção da integração e transcrição do gene foi realizada por Southern blot e RT-PCR, respectivamente. Em ambas as técnicas, foi possível verificar a presença de uma banda do tamanho esperado para *Itb-r1*, demonstrando assim, a integração e

expressão do gene. Entretanto, não foi possível detectar com precisão, através dos testes utilizados, a proteína recombinante.

Palavras-chave: *Nicotiana tabacum* L. transformação genética. vacinas recombinantes. *Mycoplasma hyopneumoniae*.

ABSTRACT

KLAFKE, Gabriel Baracy. **Integration and expression of *Itb-r1* in tobacco plants.** 2010. 63 f. Dissertation (Master Degree) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

During the past decades, the development of genetically modified plants became a consolidated reality. Taking advantage of the genetic engineering process, it is possible to obtain modified plants to use as bioreactors in the production of tissue or organs expressing antigens which can be easily used as vaccines. The plant-based expression systems as tomato and lettuce, which attend as models for that process, present innumerous advantages such as conservation of eukaryotic machinery, which promote pos-translational modifications, possibility of large-scale production and development of safer and economically more attractive vaccines. Taking use of that strategy, the Swine mycoplasma hyopneumoniae (SMP) disease can be one important and possible target to either be eradicated or controlled. The SMP, caused by fastidious bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is one of the most important respiratory disease in swine breeding, due to its very high prevalence coupled with associated losses all over the whorld, and has in the recombinant DNA technology a viable alternative in the development of more effective and safe vaccines. The objective of my work was to genetically manipulate tobacco plants in order to use them as bioreactor in the production of an antigen against PMS. Tobacco leaves and internodes were cultured in different concentrations of BAP and AIA hormones. The best regeneration results for both explants were seen with 1,5mg.L⁻¹ BAP and 0,1mg.L⁻¹ AIA. The selection test with the kanamycin antibiotic appeared to be highly effective, showing a total inhibition of regeneration with 30 mg.L⁻¹ and 100 mg.L⁻¹ for leaves and internodes respectively. The recombinant colonies of *A. tumefaciens*, containing *Itb-r*, were co-cultivated with the internodes and leaves from plants germinated *in vitro*. The next step, the explants were transferred to the selection medium in order to induce the selection of the putatively transformed cells. The genomic DNA from regenerated and putatively transformed plants were extracted and amplified by PCR, where it was detected the presence of a band referent to *Itb-r1*. The analyses of the integration and the transcription of *Itb-r1* were carried out by Southern blot and RT-PCR, respectively. In both techniques, it was possible to confirm the presence of one band which corresponds to the expected size of *Itb-r1*,

supporting the integration and expression of the gene. However, with the tests used here, it was not possible to detect with accuracy the recombinant protein

Keywords: *Nicotiana tabacum* L. genetic transformation. recombinant vaccine. *Mycoplasma hyopneumoniae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas do processo de transformação genética de plantas via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
Figura 2	Representação esquemática do vetor pGA643- <i>ltb-r1</i>	26
Figura 3	Percentagem de calo e brotos de folha de tabaco, cv. 418, submetidos a diferentes concentrações de BAP.....	32
Figura 4	Percentagem de calo, brotos e raízes de entrenós de tabaco, cv. 418, submetidos a diferentes concentrações de BAP.....	33
Figura 5	Porcentagem de sobrevivência de entrenós de tabaco, cv.418, submetidos a diferentes concentrações de canamicina.....	35
Figura 6	Explantos de tabaco, cv. 418, expressando a GFP (direita) e explantes não transformados (esquerda), 21 um dias após o processo de transformação.....	36
Figura 7	Triagem das colônias recombinantes de <i>A. tumefaciens</i> por PCR de colônia.....	37
Figura 8	Entrenós putativamente transformados de tabaco, cv. 418, submetidos ao meio seletivo.....	38
Figura 9	Aclimatização em casa de vegetação de plântulas de <i>N. tabacum</i> , cv. 418, contendo o gene <i>ltb-r1</i>	39
Figura 10	DNA genômico de tabaco.....	39
Figura 11	Amplificação do gene <i>ltb-r1</i> e 18s.....	40
Figura 12	Filme de Raio-X obtido a partir da técnica “ <i>Souther blot</i> ”.....	41
Figura 13	Extração de RNA total.....	42
Figura 14	Amplificação de <i>ltb-r1</i> e CAT por RT-PCR.....	43
Figura 15	SDS-Page.....	44
Figura 16	Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose.....	46

ABREVIACOES

μ L - Microlitro

AIA – Ácido indolil-3-acético

BAP - 6-benzilaminopurina

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Acetiltransferase cloranfenicol

cm - Centímetros

CT – Toxina de Cólera

D.O – Densidade Óptica

DAB - Diaminobenzidina

g - Gramas

h - Hora

HCl – Ácido Clorídrico

kan - Canamicina

kb - Quilobase

L - Litro

LTB – Subunidade B da enterotoxina termolábel de *E. coli*

mg - Miligrama

min - Minuto

mL – Mililitro

mM - Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

?g - Nanogramas

PBS - Tampão fosfato-salino

PBS-T – Tampão fosfato-salino com Tween-20

PVP - Polivinilpirrolidona

rpm – Rotação por minuto

V - Volts

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	9
1.0 INTRODUÇÃO GERAL	13
2.0 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3.0 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Produção de proteínas heterólogas em plantas.....	16
3.2 LTB-R1 uma alternativa contra a Pneumonia Micoplásmica Suína	17
3.3 Transformação Genética	19
3.3.1 Transformação Genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3.4 Cultura de Tecidos	21
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	223
4.1 Material Vegetal	223
4.2 Multiplicação <i>in vitro</i>	223
4.3 Tipo de explante	223
4.4 Teste de regeneração <i>in vitro</i> para explantes de tabaco.....	23
4.5 Teste <i>in vitro</i> de tolerância ao agente de seleção - canamicina	24
4.6 Análise estatística.....	24
4.7 Infecção dos tecidos via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
4.7.1 Cepa da bactéria e transformação com o vetor binário pRS037 contendo gene repórter (<i>gfp</i>).....	25
4.7.2 Crescimento da bactéria e transformação dos explantes de tabaco com o pRS037.....	25
4.7.3 Cepa da bactéria e vetor binário pGA643/ <i>ltb-r1</i>	26
4.7.4 Crescimento da bactéria e transformação dos explantes de tabaco.....	26
4.8 Análise Molecular.....	27
4.8.1 Extração e quantificação de DNA total de folhas.....	27
4.8.2 PCR para confirmação da transformação.....	27
4.8.3 Southern blot.....	27
4.8.4 Extração e quantificação de RNA.....	28

4.8.5 RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction) para detecção da transcrição do gene <i>ltb-r1</i>	28
4.8.6 Extração e concentração de proteínas totais.....	29
4.8.7 Quantificação das proteínas totais.....	29
4.8.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)	29
4.8.9 Transferência para a membrana de nitrocelulose	29
4.8.10 Detecção imunológica	30
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Regeneração <i>in vitro</i>	31
5.2 Tolerância dos explantes frente ao agente de seleção.....	34
5.3 Transformação com a cepa LBA4404 de <i>Agrobacterium</i> com o vetor binário pRS037 contendo gene repórter	35
5.4 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> com vetor binário pGA643/ <i>ltb-r1</i>	37
5.5 Transformação de plantas de tabaco com vetor binário pGA643/ <i>ltb-r1</i>	37
5.6 Extração do DNA e PCR para confirmação da transformação	38
5.7 Southern blot	40
5.8 RNA.....	41
5.9 Extração de proteínas e SDS-Page	43
5.10 Western blotting	44
6.0 CONCLUSÃO.....	48
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8.0 APÊNDICE	61

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de suínos, porém um dos principais entraves para aumento de ganho econômico do produtor é o aspecto sanitário, que se apresenta como um fator fundamental para que esta atividade seja rentável. Patologias respiratórias fazem-se presentes na maior parte das explorações no mundo inteiro e possuem considerável relevância, destacando-se a pneumonia enzoótica, também conhecida como pneumonia micoplásmica suína (PMS). A PMS é uma doença crônica e altamente contagiosa que provoca níveis elevados de morbidade, retardo do crescimento, redução da conversão alimentar e ainda severas lesões pulmonares. Seu agente etiológico é o parasita hospedeiro-específico *Mycoplasma hyopneumoniae*, encontrado na mucosa respiratória, aderido ao epitélio ciliado da traqueia, brônquios e bronquíolos. Dentre as formas de combate, a vacinação ainda é a forma mais efetiva de controlar a PMS. Entretanto, seu alto custo de produção, aliado à proteção parcial conferida por sua utilização, não impedem o surgimento da infecção nos animais, possibilitando o surgimento de novas alternativas de controle como a utilização de vacinas de última geração.

Nessa perspectiva, em 2006 foi fusionada a chamada região R1 da adesina P97 (importante região da proteína relacionada à adesão do *M. hyopneumoniae* ao epitélio respiratório) à subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) e expressa em *E. coli*, resultando em uma nova estratégia no desenvolvimento de uma vacina contra a PMS. Outros sistemas de expressão, como o vegetal e leveduras, ainda têm sido pouco explorados para a produção desse antígeno.

Nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas tornou-se uma realidade consolidada devido, principalmente, à revolução biotecnológica que ofereceu ferramentas tanto em nível celular quanto molecular, garantindo o suporte científico-tecnológico para o desenvolvimento dessa área. A partir do conhecimento acumulado através dos avanços na engenharia genética de microrganismos, o estudo detalhado dos genes e a construção de vetores de transformação expandiram-se para diferentes organismos, incluindo inúmeras espécies vegetais. Plantas podem ser utilizadas como biorreatores com inúmeras vantagens na produção de proteínas heterólogas em relação a outros sistemas de produção (fermentação microbiana, animais transgênicos, por exemplo).

O crescente e recente interesse nessa área amplia a demanda de pesquisas de fronteira e com grande potencial para a produção de vacinas, a qual é segura e econômica quando comparada com os sistemas já utilizados.

Dentre as plantas mais utilizadas para este sistema, encontra-se o tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), espécie vegetal pertencente à família Solanaceae. Essa planta possui um histórico como planta-modelo para a transformação genética vegetal, sendo a mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes nas pesquisas em laboratório. As principais vantagens da utilização dessa espécie incluem sua alta taxa de regeneração *in vitro*, genoma pequeno, tecnologia estabelecida na transferência e expressão gênica, alto rendimento de biomassa, capacidade de produção rápida em larga-escala devido ao ciclo curto, alta produção de sementes, e a disponibilidade de infra-estrutura para o processamento em larga-escala.

A produção de vacinas baseadas em plantas apresenta uma série de vantagens sobre os métodos tradicionais. Dentre elas, pode-se citar, o uso do sistema de expressão vegetal, que contempla a exploração do aparato eucarioto nas modificações pós-traducionais, como por exemplo, nas etapas de glicosilação e acetilação, garantindo assim, a atividade biológica da proteína, menor custo e facilidade de produção em grande escala.

1 **2.0 OBJETIVOS**

2

3 **2.1 Objetivo Geral**

4 - Obter plantas de tabaco expressando o gene *ltb-r1*, visando à produção do
5 antígeno LTB-R1 contra a pneumonia micoplásmica suína.

6

7 **2.2 Objetivos Específicos**

8 - Implantação e desenvolvimento do sistema de transformação, seleção e
9 regeneração *in vitro* de *Nicotiana tabacum* L. (cv. 418);

10 - Obtenção de plantas geneticamente modificadas de forma estável;

11 - Avaliação dos níveis de expressão do transgene, através de técnicas
12 moleculares.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **3.0 REVISÃO DA LITERATURA**

2

3 **3.1 Produção de proteínas heterólogas em plantas**

4 Plantas vêm sendo investigadas extensivamente como uma fonte potencial
5 para a produção de proteínas heterólogas. No entanto, para o sistema de expressão
6 ser eficiente, ele deve ter a capacidade de produzir proteínas em grande escala, de
7 maneira segura e possibilitar a atividade biológica da proteína em questão
8 (DANIELL; STREATFIELD; WYCOFF, 2001). Ao longo dos anos, muitas fontes
9 nativas de proteínas foram substituídas por sistemas recombinantes microbianos por
10 questões de economia e segurança (STREATFIELD, 2007). Porém, microrganismos
11 recombinantes começaram a apresentar desvantagens e limitações permitindo
12 assim, o surgimento de novos sistemas de expressão que passaram a ser utilizados
13 para a produção de proteínas recombinantes (KOST; CONDREAY, 1999;
14 HOUDEBINE, 2002). Dentre os atuais sistemas de expressão, destaca-se o baseado
15 em vegetais que apresenta vários benefícios, tais como a relativa facilidade de
16 manipulação do genoma vegetal, conservação da máquina eucariótica que promove
17 a modificação das proteínas (acetilação, fosforilação, glicosilação, por exemplo), a
18 possibilidade de produção em larga escala, baixo custo em comparação a outros
19 sistemas de expressão e a ausência do risco de contaminação com patógenos
20 animais (FISHER; EMANS, 2000; GIDDINGS, 2001; MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003;
21 SCHILLBERG; TWYMAN; FISCHER, 2005). Com o avanço e melhorias
22 apresentadas pelos protocolos de transformação, aliados aos de regeneração de
23 plantas, tornou-se possível o seu uso para a produção de várias proteínas
24 recombinantes com eficiência e produção em escala comercial. Em 1989, foi
25 demonstrado o primeiro uso de uma planta transgênica expressando eficientemente
26 um anticorpo completo em tabaco (HIATT; CAFFERKEY; BOWDISH, 1989).
27 Pesquisas ao longo dos últimos anos têm mostrado um grande aumento da
28 quantidade de proteínas importantes e de valor econômico que podem ser expressas
29 em plantas, tais como antígenos, proteínas humanas, anticorpos, enzimas
30 industriais, reguladores de crescimento e biopolímeros (LARRICK; THOMAS, 2001;
31 TWYMAN et al., 2003; HOOD; WOODARD; HORN, 2002; LARRICK et al., 2001;
32 FISCHER et al., 1999). Porém, alguns entraves como a purificação e a extração das
33 proteínas dos tecidos vegetais têm sido retratados como os principais obstáculos na

1 utilização de vegetais como biorreatores, resultando assim em um aumento
2 considerável no custo final de produção desse sistema (STOGER et al., 2000).
3 Entretanto, algumas plantas ou tecidos vegetais podem servir diretamente como
4 veículo, o que se torna ideal em alguns casos como na administração oral de
5 antígenos de forma *in natura* ou após processamentos (farinhas, etc) tornando
6 desnecessária purificação da proteína em questão (STREATFIELD, 2006).

7 Dentre as espécies vegetais mais utilizadas nos processos de transformação
8 e expressão heteróloga de proteínas, encontra-se o Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.).
9 Algumas vantagens como a presença de um pequeno genoma, fácil manipulação *in*
10 *vitro*, grande número de sementes, alta produção por hectare, ciclo curto, protocolos
11 de regeneração estabelecidos, entre outras, tornam essa espécie uma das mais
12 apropriadas nos processos de transformação e expressão (DANIELL;
13 STREATFIELD; WYCOFF, 2001; DUNG et al., 2006; ROMMENS, 2006).

14

15 **3.2 LTB-R1 uma alternativa contra a Pneumonia Micoplásmica Suína**

16 A Pneumonia Enzoótica ou Pneumonia Micoplásmica Suína (PMS), causada
17 pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, é uma doença crônica e altamente contagiosa que
18 provoca alta morbidade, retardo do crescimento, menor eficiência alimentar dos
19 animais e ainda severas lesões pulmonares (OBOEGBULEN, 1981). Tem como
20 agente etiológico o parasita hospedeiro-específico *Mycoplasma hyopneumoniae* que é
21 encontrado na mucosa respiratória, aderido ao epitélio ciliado da traqueia, brônquios
22 e bronquíolos causando a chamada broncopneumonia catarral que, clinicamente, se
23 manifesta por tosse seca, atraso no ganho de peso e complicações
24 broncopulmonares purulentas resultando em uma maior propensão a infecções
25 secundárias (STEVENSON, 1998; YOUNG et al., 2000). Os mecanismos de
26 transmissão ocorrem por contato direto e indireto (utensílios). Dois dos principais
27 fatores de patogenia do *M. hyopneumoniae* devem-se a destruição do epitélio ciliar do
28 trato respiratório reduzindo conseqüentemente a capacidade de defesa deste e
29 ainda a interação do agente com células linfoides, fazendo que ocorra a alteração da
30 atividade fagocítica. As perdas econômicas decorrentes da Pneumonia Enzoótica
31 podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de
32 peso, dependendo da gravidade das lesões e das infecções secundárias
33 (SOBESTIANSKY et al., 1999). A infecção por micoplasma é frequente em todas as

1 regiões do mundo onde a suinocultura é desenvolvida resultando em grandes percas
2 econômicas. Portanto, novas estratégias de controle para essa doença devem ser
3 implantadas o mais breve possível.

4 Micoplasmas são organismos procarióticos que não possuem parede celular,
5 pertencentes à classe Mollicutes. Decorrente da ausência de parede celular, eles
6 apresentam uma morfologia bastante pleomórfica podendo ser encontrado células
7 em forma de pera, espiral, esférica, ou filamentosa (CONCEIÇÃO, 2005). Possuem
8 um genoma pequeno (580 a 2.200 kb), sendo os menores organismos auto-
9 replicantes conhecidos e difíceis de serem cultivados *in vitro*. Porém, *M.*
10 *hyopneumoniae* pode ser cultivável, desde que a cultura seja em um meio enriquecido
11 (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Este fato, somado ao seu crescimento pobre e lento,
12 encarece excessivamente a produção de vacinas preparadas com células totais
13 mortas (bacterinas), que são as mais utilizadas no controle da PMS (FAGAN et al,
14 1997; CHEN; LIAO; MAO, 2001). Embora, a vacinação ainda pareça ser a forma
15 mais efetiva de controlar essa pneumonia, ela é capaz de gerar uma proteção parcial
16 que não impede o surgimento da infecção nos animais, uma vez que este tipo de
17 vacina não estimula uma apropriada imunidade de mucosa (SOBESTIANSKY;
18 BARCELLOS; MORES, 1999; LIN et al. 2003; CONCEIÇÃO, 2005; MCGHEE et al.,
19 1992). Nesse aspecto a utilização de vacinas de última geração tem se mostrado
20 promissora no combate de diversas patologias incluindo a PMS (CONCEIÇÃO,
21 2005).

22 A adesão do *M. hyopneumoniae* aos cílios é provocada por uma adesina
23 designada P97 que possui em seu epítopo uma sequência repetitiva de cinco
24 aminoácidos (AAKPV/E) localizada na porção C terminal da proteína, referida como
25 região R1, que é altamente imunogênica (ZHANG; YOUNG; ROSS, 1995). Os
26 anticorpos monoclonais reconhecem a P97 e também bloqueiam a aderência do *M.*
27 *hyopneumoniae* a células ciliadas *in vitro* o que indica que esta adesina possui papel
28 fundamental na patogenia de PMS, tornando-a uma forte candidata a ser utilizada na
29 produção de vacinas (HSU; ARTIUSHIN; MINION, 1997). Mas, geralmente as
30 vacinas de subunidade não são suficientemente imunogênicas a ponto de gerar uma
31 imunidade protetora, tornando-se imprescindível à adição de outros componentes
32 tais como adjuvantes imunológicos que são inseridos nas preparações. Dentre eles a
33 subunidade B da enterotoxina termolábel de *Escherichia coli* (LTB), tem sido
34 largamente utilizada como adjuvante da imunidade de mucosa (VERWEIJ; HAAN;

1 HOLTROP, 1998). A LTB possui cinco peptídeos idênticos (pentâmero), cada
2 monômero apresenta um domínio que possui alta afinidade pelo gangliosídeo GM1,
3 um receptor de membrana presente em todas as células de mamíferos nucleadas e
4 principalmente nas células epiteliais das mucosas (LILJEQVIST; STAHL;
5 ANDRÉONI, 1997; CHIKWAMBA et al., 2002). A atividade adjuvante da LTB parece
6 estar relacionada com a capacidade de ligação ao GM1 (WALMSLEY et al., 2003).
7 Esta subunidade atóxica, potente adjuvante de mucosa, estimula uma forte resposta
8 sistêmica e secretória (IgAs) de anticorpos contra antígenos co-administrados ou
9 acoplados. A LTB recombinante, fusionada com antígenos através de fusão genética
10 ou conjugação química, pode representar uma nova alternativa no desenvolvimento
11 de vacinas para combater patógenos que invadem o hospedeiro através das
12 mucosas provocando uma imunidade protetora (OIEN et al., 1994; CONCEIÇÃO,
13 2005).

14 Em estudo recente realizado por Conceição (2005), a região R1 de P97
15 fusionada ao fragmento B da toxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB-R1), comprovou
16 o potencial desta construção como imunógeno protetor contra PMS.

17

18 **3.3 Transformação Genética**

19 O desenvolvimento de técnicas de manipulação do DNA a partir do início da
20 década de 70 possibilitou o isolamento ou a chamada “clonagem” dos genes que
21 apresentavam algum tipo de interesse e que puderam, mais tarde, ser transferidos
22 de um indivíduo para outro. Desde então, técnicas foram criadas possibilitando a
23 transformação genética em diferentes organismos. A transformação genética é
24 definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucleicos (DNA) em um
25 genoma receptor, excluindo-se introdução por fecundação, ou seja, apenas um
26 fragmento de DNA é introduzido no genoma hospedeiro, devendo ser a ele integrado
27 (TACCHINI; WALBOT, 1986). Genes funcionais uma vez isolados podem ser
28 clonados, sequenciados e introduzidos em um genoma, permitindo assim a
29 introdução de uma característica de interesse agrônômico, bem como possibilitar a
30 expressão heteróloga de proteínas de diferentes interesses farmacêuticos em
31 vegetais (FILHO; CASCARDO; FONTES, 1998). Atualmente, diferentes técnicas de
32 transformação de plantas têm sido empregadas aliando a cultura de tecidos e a
33 engenharia genética.

34

1 **3.3.1 Transformação Genética via *Agrobacterium tumefaciens*:**

2 Diversos genes já foram introduzidos estavelmente em plantas, conferindo
3 resistência a herbicidas, fungos, bactérias, vírus, insetos e resistência a estresses
4 ambientais, bem como genes que expressam proteínas de outros organismos
5 (SANTARÉM, 2000; HUANG et al., 2002; JAMES, 2006; YU; LANGRIDGE, 2001;
6 MUNYIKWA, 1998; RYBICKI, 2009). Esses resultados somente tiveram êxito pela
7 manipulação adequada de células e tecidos e pela introdução de genes exógenos
8 por métodos diretos ou indiretos de transformação. Os métodos diretos são aqueles
9 que não necessitam da utilização de vetores biológicos resultando de mecanismos
10 físicos ou químicos que promovem modificações em nível de parede e membrana
11 celular. Dentre as técnicas diretas encontram-se a transformação por
12 polietilenoglicol, aceleração de partículas e eletroporação de protoplastos (VIDAL,
13 2002; SLATER; SCOTT; FOWLER, 2008). Já os métodos indiretos são aqueles que
14 necessitam da utilização de um vetor que é responsável por carrear e integrar o
15 gene exógeno ao DNA genômico hospedeiro da planta

16 A técnica mais empregada de transferência indireta de genes é o uso da
17 bactéria do gênero *Agrobacterium*, um microrganismo do solo, aeróbica, Gram negativa
18 em forma de bastão, pertencente à Família *Rhizobiaceae*, capaz de infectar células
19 vegetais, transportando naturalmente o DNA entre o microrganismo e a planta
20 (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003; CITOVSKY et al., 2007). Assim, a
21 *Agrobacterium* é uma poderosa ferramenta para transferência de genes para as
22 plantas. Possui o plasmídeo Ti que é formado por uma fita dupla de DNA, cópia
23 única com cerca de 200 kb onde estão presentes as duas principais regiões
24 conhecidas como T-DNA e região Vir. O T-DNA (do inglês 'Transferred DNA'),
25 presente no plasmídeo Ti, é transferido para dentro da célula vegetal, integrado ao
26 genoma nuclear e expresso de maneira estável (ZUPAN; ZAMBRYSKI, 1995). Essa
27 região é delimitada por 25 pares de base e, é transferida como fita simples de DNA
28 associado a proteínas codificadas pela região Vir. De acordo com Gelvin (2003), o
29 DNA de transferência é integrado no genoma da planta e regulado pelo sistema de
30 transcrição eucariótico. Além da região T-DNA, a chamada região de virulência ou
31 região Vir contém os genes que codificam enzimas responsáveis pela excisão e
32 transferência do T-DNA do microrganismo para a planta. Após um ferimento na
33 planta, os compostos gerados pela lesão acabam induzindo a expressão dos genes
34 *vir* da *Agrobacterium* (SHENG; CITOVSKY, 1996). A interação entre as espécies de

1 *Agrobacterium* e as plantas envolve uma complexa série de sinalizadores químicos que
 2 propiciam a comunicação entre a planta hospedeira e o patógeno (VIDAL, 2002).
 3 Mais de 600 espécies vegetais são conhecidas como suscetíveis à infecção por *A.*
 4 *tumefaciens* e *A. rhizogenes* sendo, portanto, um eficiente mecanismo de transformação
 5 principalmente em plantas dicotiledôneas (BRASILEIRO, 1998; GAMA et al., 1996;
 6 TZFIRA; CITOVSKY, 2006). A transformação por *Agrobacterium* é considerada um dos
 7 processos mais preciso de transformação integrando uma ou poucas cópias por
 8 genoma da planta (TRAVELLA; ROSS; HARDEN, 2005). De acordo com Andrade et
 9 al. (2003), o baixo custo operacional e a facilidade dos protocolos, além da alta
 10 eficiência de transformação, tornaram a transformação via *A. tumefaciens* um dos mais
 11 utilizados. Uma abordagem geral do processo pode-se ser visualizada na figura 1.

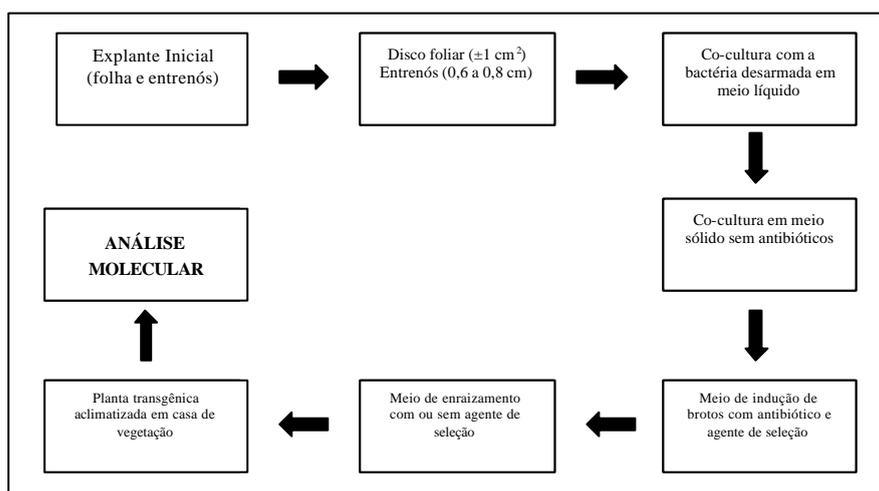


Figura 1. Etapas do processo de transformação genética de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*.

3.4 Cultura de Tecidos

A propagação de vegetais *in vitro* tem sido motivo de interesse de pesquisadores há muito tempo. O cultivo celular de tecidos somáticos de plantas em solução nutritiva tem sido realizado desde o início do século XX (KRIKORIAN; BERQUAM, 1969). A cultura de tecidos, que é definida como o conjunto de técnicas de excisão, desinfestação e cultura, em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, tecidos ou órgãos de planta, tornou-se uma importante ferramenta que favoreceu o surgimento de novas metodologias para o melhoramento de plantas e suas distintas fases de desenvolvimento (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). Dentre as principais contribuições promovidas pela cultura de tecidos pode-se destacar a

1 possibilidade de conservação e avaliação do germoplasma *in vitro*, o aumento da
2 variabilidade genética para fins de seleção (obtenção de variantes somaclonais e
3 transformantes via engenharia genética), introgressão de genes de interesse para
4 espécies-alvo (quebra de barreiras de incompatibilidade) e ainda a aceleração do
5 programas de melhoramento (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998).

6 A técnica de cultura de tecidos está baseada no fenômeno da totipotência
7 que as células vegetais possuem, ou seja, a capacidade que cada célula tem de
8 desenvolver uma nova planta quando colocada em condições especiais para que
9 ocorra o processo de diferenciação (ANDRADE, 2002). Aproveitando a capacidade
10 de se organizar em um novo indivíduo, conservando a carga genética necessária e
11 sem haver recombinação gênica, originando um novo indivíduo idêntico ao da planta
12 doadora do tecido, a cultura de tecidos tem se mostrado uma técnica muito
13 importante para obtenção de plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente modificadas
14 que podem ser amplamente multiplicadas (TORRES et al., 2000). As condições
15 ideais de incubação e assepsia e a obtenção de altas ou baixas taxas de
16 regeneração podem depender do tipo de resposta dos explantes, pois eles
17 apresentam células em diferentes níveis fisiológicos e bioquímicos e ainda diversos
18 graus de diferenciação nos tecidos. Porém, em alguns tipos, a diferenciação é mais
19 facilmente obtida frente às condições oferecidas *in vitro* (CID, 1998; KERBAUY,
20 1999).

21 De acordo com Andrade (2002), o sucesso da iniciação e regeneração da
22 cultura *in vitro* depende da escolha correta de três principais fatores: o genótipo (qual
23 espécie, cultivar ou variedade a ser utilizada), a fonte de explantes (folha, raiz, caule,
24 meristema, etc) e a condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura). A
25 padronização de protocolos eficazes de regeneração *in vitro* é algo fundamental e
26 necessário para que seja possível o emprego das técnicas de biologia molecular em
27 vegetais. No entanto, as condições estabelecidas para uma cultivar ou genótipo
28 serão dificilmente adotadas a outras espécies ou até mesmo dentro da mesma
29 (GRAY; MC COLLEY; COMPTON, 1993).

30

31

32

33

1 **4.0 MATERIAL E MÉTODOS**

2
3 O presente trabalho foi desenvolvido em uma parceria entre o Laboratório de
4 Biologia Celular e Molecular de Plantas do Centro de Biotecnologia e o Laboratório
5 de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica/Instituto de Biologia,
6 ambos na Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

7 8 **4.1 Material vegetal**

9 O material vegetal utilizado no trabalho foi obtido de plantas de tabaco
10 (*Nicotiana tabacum* L.), cv. 418. As sementes foram cedidas pela empresa Souza Cruz.
11 As plantas foram mantidas em cultivo *in vitro* em sala de crescimento. Inicialmente,
12 as sementes utilizadas foram desinfestadas a partir de imersões sucessivas (sob
13 agitação) em etanol 70% por 2 min, tween 20 a 10% por 2 min e hipoclorito de sódio
14 2,5% por 30 min; sendo a seguir, lavadas três vezes em água destilada estéril e
15 transferidas para meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962).

16 17 **4.2 Multiplicação *in vitro***

18 Em todos os experimentos utilizou-se o meio de cultura MS acrescido de 1,0
19 mg.L⁻¹ de tiamina e sacarose a 3%. O cultivo *in vitro* foi realizado em câmara de
20 crescimento com densidade de fluxo de fótons de 30 μmol.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 16
21 horas e temperatura de 23 ± 1 °C.

22 23 **4.3 Tipo de explante**

24 Foram utilizados como explantes segmentos de folhas e entrenós obtidos a
25 partir de plantas cultivadas *in vitro*, em fase de multiplicação, com 20 dias após a
26 primeira repicagem do material. Os explantes foram constituídos por entrenós (0,6 a
27 0,8 cm de comprimento), e explantes foliares (±1 cm²) os quais foram obtidos
28 cortando-se perpendicular e horizontalmente a nervura central e, sendo colocados
29 com a superfície abaxial em contato com o meio.

30 31 **4.4 Teste de regeneração *in vitro* para explantes de tabaco**

32 Os meios de regeneração utilizados em explantes foliares constituíram-se do
33 meio MS suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ de AIA (concentração fixa) com 0; 0,5; 1,0;

1 1,5 e 2 mg.L⁻¹ de BAP. Já para entrenós foi utilizado a mesma concentração de AIA
2 com 0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. Todos os meios foram renovados a cada quinze
3 dias.

4 4.5 Teste *in vitro* de tolerância ao agente de seleção - canamicina

6 No teste de tolerância (seleção *in vitro*) foram utilizados explantes (entrenós
7 e folhas de plantas de tabaco) mantidos *in vitro*. O meio de cultura utilizado no
8 experimento foi renovado a cada quinze dias. Para a determinação da resistência
9 dos tecidos ao antibiótico, os explantes foram submetidos às concentrações de 0,
10 30, 50, 75, 100 mg.L⁻¹ de canamicina no meio de regeneração composto do meio
11 básico contendo 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ AIA para explantes foliares e
12 entrenós.

13

14 4.6 Análise estatística

15 O delineamento experimental adotado no experimento de regeneração foi
16 inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5 para folhas e 2x4 para entrenós,
17 sendo os explantes e as doses de reguladores de crescimento os fatores
18 considerados. Para o experimento de tolerância, a concentração do antibiótico e os
19 explantes foram os fatores avaliados. Foram utilizadas três repetições por
20 tratamento, cada uma representada por um frasco contendo dez explantes. Os
21 dados experimentais foram submetidos à análise de variância, testes de médias
22 (Tukey a 5% de probabilidade) e análise de regressão polinomial, através do Sistema
23 de Análise Estatística Winstat, versão 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

24 Os dados expressos em porcentagem foram transformados segundo arco
25 seno raiz quadrada de (x/100), onde x representa o valor percentual obtido para as
26 variáveis analisadas. As variáveis analisadas foram sobrevivência, formação de
27 calos, brotos e raízes. A avaliação dos dados citados acima foi realizada trinta dias
28 após o início do experimento.

29

30 4.7 Infecção dos tecidos via *Agrobacterium tumefaciens*

31

32

33

34

1 **4.7.1 Cepa da bactéria e transformação com o vetor binário pRS037 contendo** 2 **gene repórter (*gfp*)**

3 Nos experimentos de transformação genética via *A. tumefaciens* foi utilizada a
4 cepa desarmada LBA4404 com resistência genômica ao antibiótico rifampicina.

5 A transformação da cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* com o plasmídeo
6 pRS037, contendo o gene que codifica para “*green fluorescent protein*” (GFP), foi
7 feita por choque térmico, conforme descrito por Brasileiro et al. (1998), com algumas
8 modificações no tempo de co-cultivo. O vetor pRS037 de aproximadamente 14kb,
9 apresentando o cassete (35S::mGFP-ER-NOS) foi utilizado como marcador para
10 avaliação preliminar do processo de transformação.

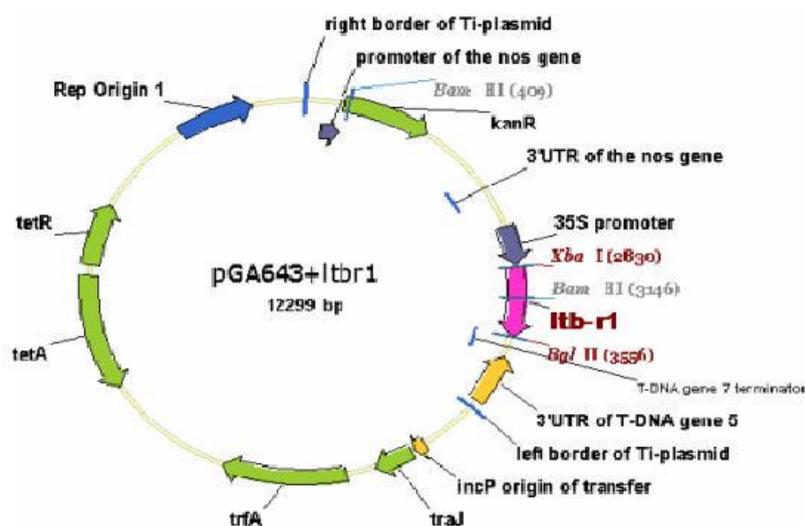
11 12 **4.7.2 Crescimento da bactéria e transformação dos explantes de tabaco com o** 13 **pRS037**

14 A cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* portando o pRS037 (canamicina^R e
15 gentamicina^R) foi cultivada a 28 °C por 24 h, em meio Lúria Bertani (LB) semi sólido.
16 Antes da semeadura em placa da bactéria, foram adicionados os antibióticos de
17 seleção: rifampicina (50 mg. L⁻¹), canamicina (50 mg. L⁻¹) e gentamicina (25 mg. L⁻¹)
18 filtro-esterelizados (Millipore Millex 0,22 µm). As placas com as bactérias foram
19 mantidas no escuro a 28 °C por 24 h. Uma colônia foi isolada e extraída desse pré-
20 cultivo, transferida para 50 mL do mesmo meio seletivo, não geleificado. A
21 suspensão foi cultivada em estufa a 28 °C, sob agitação de 150 rpm até atingir
22 D.O⁶⁰⁰ entre 0,5 e 1,0. Após, explantes, obtidos de entrenós e folhas, foram
23 excisados e imersos no co-cultivo (suspensão de *A. tumefaciens* LBA4404 contendo o
24 pRS037) por 15 min. Os entrenós foram enxugados com papel filtro e transferidos
25 para o meio básico contendo 0,1 mg.L⁻¹ de AIA e 1,5 de mg.L⁻¹ de BAP para
26 entrenós e folha, onde permaneceram por 48 h no escuro. A seguir foi realizada a
27 passagem dos mesmos para o meio de regeneração com adição do antibiótico de
28 seleção 50mg.L⁻¹ canamicina e 100 mg.L⁻¹ de claforam (para eliminação de
29 *Agrobacterium*). Semanalmente esses explantes foram repicados para novos meios
30 seletivos contendo a mesma concentração descrita acima e submetidos a luz UV
31 para avaliação da fluorescência.

32
33
34

1 4.7.3 Cepa da bactéria e vetor binário pGA643/*ltb-r1*

2 A transformação da cepa LBA4404 com o pGA643/*ltb-r1* foi realizada por
 3 choque térmico. O plasmídeo pGA643/*ltb-r1* de 12 kb, apresentava a seguinte
 4 constituição: borda direita do T-DNA; UTR- região não traduzida; P35S- promotor
 5 35S do vírus mosaico da couve-flor; *ltb-r1* sequência que codifica a quimera *ltb-r1*;
 6 kan^R- sequência que codifica para a neomicina fosfotransferase; borda esquerda do
 7 T-DNA (figura 1).



8
 9 FIGURA 2. Representação esquemática do vetor pGA643-*ltb-r1* contendo o gene *ltb-*
 10 *r1*, gerado pelo software Vector NTI 10.0 Advanced.

11

12 4.7.4 Crescimento da bactéria e transformação dos explantes de tabaco

13 A cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* portando o pGA643-*ltb-r1* (canamicina^R e
 14 tetraciclina^R) foi cultivada a 28 °C por 24 h, em meio LB semi sólido. Antes da
 15 inoculação da bactéria, foram adicionados os antibióticos de seleção rifampicina (50
 16 mg.L⁻¹), canamicina (50 mg.L⁻¹) e tetraciclina (2,5 mg.L⁻¹) filtro-esterelizados
 17 (Millipore Millex 0,22 µm). As placas com as bactérias foram mantidas no escuro a 28
 18 °C por 24 h. Uma colônia foi isolada e extraída desse pré-cultivo, sendo em seguida
 19 transferida para 50 mL do mesmo meio seletivo não geleificado. A suspensão foi
 20 cultivada em estufa a 28 °C, sob agitação de 150 rpm até atingir D.O⁶⁰⁰ entre 0,5 e
 21 1,0. Explantes foram excisados e imersos no meio de co-cultivo por 15 min,
 22 imediatamente passados no papel filtro e transferidos para o meio de regeneração
 23 contendo 0,1 mg.L⁻¹ de AIA e 1,5 de mg.L⁻¹ de BAP para entrenós e folha, onde
 24 permaneceram por 48 h na ausência de luz. Após este período, os explantes foram

1 transferidos para o mesmo meio contendo 50 mg.L⁻¹ de canamicina e 100 mg.L⁻¹ de
2 claforam (para eliminação de *Agrobacterium*). Semanalmente os explantes foram
3 transferidos para os mesmos meios seletivos contendo a mesma concentração
4 descrita acima. Após a regeneração *in vitro* e enraizamento das brotações, estas
5 foram transferidas para a casa de vegetação para completar seu ciclo.

6 7 **4.8 Análise Molecular**

8 9 **4.8.1 Extração e quantificação de DNA total de folhas**

10 O DNA genômico foi extraído de folhas de plântulas oriundas do cultivo *in*
11 *vitro*. O protocolo de extração utilizado baseia-se no uso do detergente catiônico
12 CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987).

13 A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1,0% submetido à
14 eletroforese. O marcador utilizado como base foi o fago λ digerido com *HindIII*
15 (Invitrogen).

16 17 **4.8.2 PCR para confirmação da transformação**

18 A partir da obtenção do DNA genômico de folhas das plantas de tabaco
19 resistente ao antibiótico de seleção, foi realizada a reação de PCR utilizando os
20 *primers* “forward” LTBR1/Tab-F (5’ GAGTCTAGATCCATGGCTCCCCAG 3’) e
21 “reverse” LTBR1/Tab-R (5’ GGAAGATCTTCAATGGTGATGGTG 3’) específicos para
22 amplificação do gene *ltb-r1*. A PCR foi realizada sob as seguintes condições:
23 desnaturação inicial a 95 °C por 5 min seguido de 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 57 °C
24 por 45 s, 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 5 min. A análise da
25 amplificação foi realizada em gel de agarose 1,0% submetido à eletroforese (100V)
26 utilizando o marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen). Como controle
27 positivo foi utilizado a amplificação do gene *ltb-r1*, obtido a partir do plasmídeo
28 pGA643-*ltb-r1*.

29 30 **4.8.3 Southern blot**

31 A fim de detectar a integração do *ltb-r1* no genoma das plantas, foi realizada
32 a técnica de hibridização de DNA denominada “*Southern blot*”. Inicialmente o DNA
33 genômico das plantas potencialmente transformadas foi digerido por 16 h em banho-
34 maria a 37 °C, separadamente com as seguintes enzimas: *XbaI* e *BglII* (corte

1 frequente), além de *KpnI* (corte raro). Após a digestão, um gel de agarose 1,0% de
2 10 x 10 cm foi preparado e 45 µL de cada amostra digerida foi submetida à
3 eletroforese “overnight” a 30 V. Para produção da sonda, a sequência *ltb-r1* foi
4 amplificada por PCR, purificada utilizando o Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC),
5 quantificada e diluída (à concentração de 10 µg/µL). As condições para o preparo da
6 sonda foram seguidas de acordo com o kit ECL® Direct Nucleic Acid Labelling and
7 Detection Systems (Amersham Biosciences). A transferência dos fragmentos de
8 DNA contidos no gel para a membrana de nitrocelulose Hybond-N⁺ (Amersham
9 Biosciences) e a hibridização seguiu as instruções recomendadas pelo fabricante. A
10 detecção quimioluminescente foi realizada com o kit ECL® Western Blotting
11 Analyses System/Amersham Biosciences, utilizando-se filme de raios-X (Kodak).

12

13 **4.8.4 Extração e quantificação de RNA**

14 Folhas jovens de tabaco foram excisadas de plantas potencialmente
15 transformadas e não transformadas (controle negativo) e mantidas em nitrogênio
16 líquido. A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente Concert®
17 (Invitrogen).

18 A quantificação de RNA total foi realizada em gel de agarose 1,0%
19 submetido à eletroforese. O marcador utilizado como base foi o fago λ digerido com
20 *HindIII* (Invitrogen).

21

22 **4.8.5 RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction) para** 23 **detecção da transcrição do gene *ltb-r1***

24 A partir do RNA total, foi produzido cDNA (DNA complementar) pela técnica
25 RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction) baseada na
26 utilização da enzima transcriptase reversa seguindo as recomendações do kit
27 SuperScript®First-Strand Synthesis System (Invitrogen). O cDNA obtido, foi utilizado
28 como molde para a reação de PCR clássica. Além da reação de amplificação com
29 *primers* “forward” LTBR1/Tab-F (5' GAGTCTAGATCCATGGCTCCCCAG 3') e
30 “reverse” LTBR1/Tab-R (5' GGAAGATCTTCAATGGTGATGGTG 3') específicos para
31 amplificação do gene *ltb-r1*, foi realizada também, reações com *primers* para CAT
32 como controle positivo da reação de RT-PCR.

33

1 **4.8.6 Extração e concentração de proteínas totais**

2 A extração de proteínas de folhas de tabaco foi executada segundo método
3 utilizado por Brasileiro et al. (1998). Cerca de 1g de tecido de folhas foram excisados
4 de plantas transformadas e não transformadas (controle negativo) já aclimatizadas
5 em casa de vegetação. Objetivando obter um melhor resultado na detecção da
6 expressão da quimera LTB-R1, as proteínas extraídas (~1 mL), foram concentradas
7 utilizando a técnica de precipitação por acetona (1:5). Após a formação do “pelet”, o
8 mesmo foi ressuscitado em tampão (200mM Tris-HCl pH 8,0; 100mM NaCl;
9 400mM Sacarose; 10mM EDTA; 0,05% Tween-20; 1% PVP) e armazenados a -20°
10 C.

11 **4.8.7 Quantificação das proteínas totais**

12 A quantificação das amostras de proteínas foi realizada através do kit
13 Pierce® Bca Protein Assay (Thermo Scientific), sendo então realizado cálculo para a
14 padronização das amostras a serem utilizadas na técnica de hibridização de
15 proteínas (Western blotting).
16

17 **4.8.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)**

18 As amostras de proteínas devidamente quantificadas foram desnaturadas
19 (por 10 min a 99 °C) na presença de tampão de amostra de SDS-Page (contendo β-
20 mercaptoetanol), sendo imediatamente submetida à eletroforese em gel de
21 poliacrilamida à 12%. A proteína LTB-R1 purificada e concentrada de *E. coli* foi
22 utilizada como controle positivo. A voltagem inicial à qual as amostras foram
23 submetidas foi 60 V, sendo alterada para 120 V após entrada das amostras no gel
24 de resolução. Em seguida, corou-se o gel com solução Comassie Blue, deixando
25 esta reagir por 1 h sendo então imediatamente descorada utilizando-se água quente
26 repetidas vezes até a visualização nítida das bandas.
27

28 **4.8.9 Transferência para a membrana de nitrocelulose**

29 Após montada a “estrutura” para transferência, esta foi então inserida no
30 “blotter” (Bio-Rad Trans-Blot Cell), e procedeu-se a transferência a 30V “overnight”.
31 Em seguida, a membrana de nitrocelulose Hybond-HCL (Amersham Biosciences) foi
32 corada com a solução Ponceau S, para verificar a eficiência de transferência das
33 proteínas, sendo a seguir descorada com água.
34

1 **4.8.10 Detecção imunológica**

2 Para a detecção imunológica a membrana foi bloqueada por incubação
3 “overnight” em solução de PBS com 5% de BSA e lavada três vezes com PBS-T, por
4 5 min. Logo após, a membrana foi incubada por 1 h à temperatura ambiente, sob
5 agitação, com solução de PBS-T acrescida dos anticorpos primários: anti-CT (para a
6 detecção de LTB) e F1B6 (para a detecção de R1), ambos na diluição de 1:2.500. A
7 membrana foi lavada três vezes com PBS-T e incubada novamente por 1 h à
8 temperatura ambiente, sob agitação, com solução de PBS-T acrescida dos
9 anticorpos secundários conjugados com peroxidase: anti-coelho (para LTB) e anti-
10 camundongo (para R1), ambos a diluição de 1:2.500. Por fim, lavada mais três vezes
11 com PBS-T, sendo a seguir realizada a detecção colorimétrica utilizando o reagente
12 DAB, pela presença ou ausência de banda.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 **5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

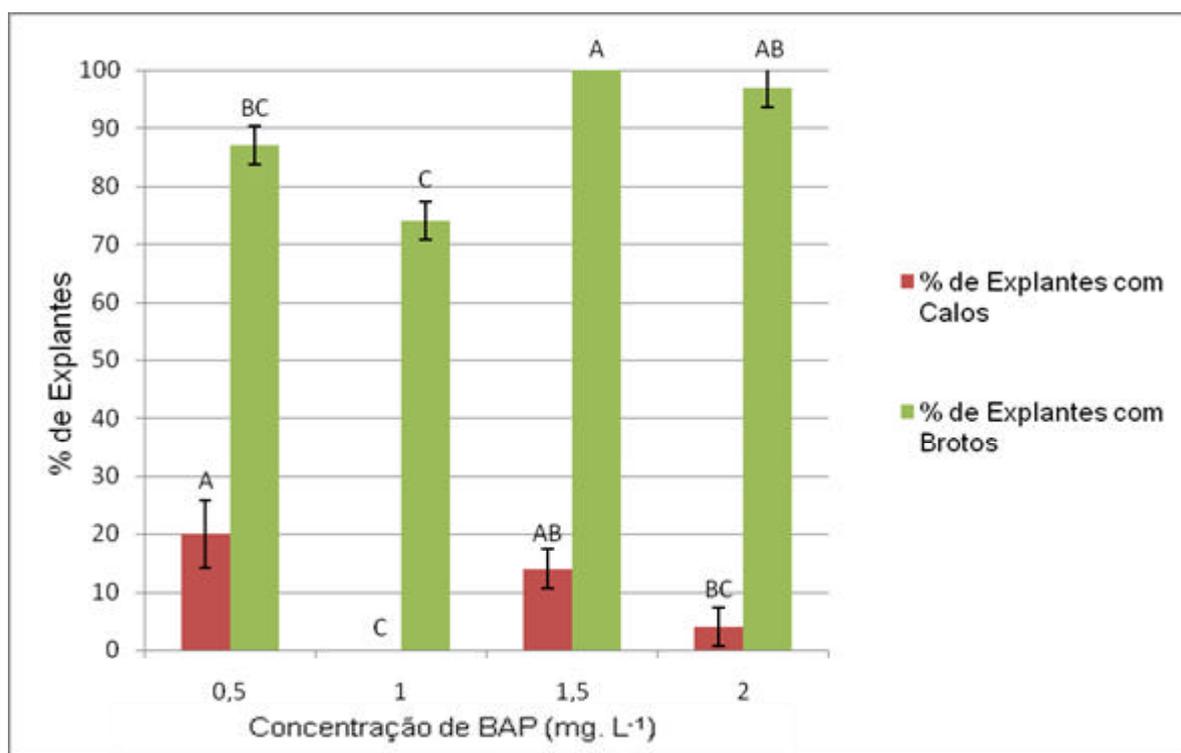
3 **5.1 Regeneração *in vitro***

4 Os ensaios de regeneração utilizaram diferentes combinações de
5 concentrações de reguladores de crescimento, a fim de estimular a morfogênese nos
6 explantes escolhidos (entrenó e folha) de tabaco, cv. 418. A concentração 1,5mg.L⁻¹
7 de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA para folha (figura 2) e entrenó (figura 3) promoveu as
8 melhores respostas percentuais na formação de brotos, 100% e 90%
9 respectivamente, sendo esse um dos principais fatores a ser considerado no
10 processo de regeneração. Coutinho (2005), utilizando 1 mg.L⁻¹ de CIN na
11 regeneração de entrenós de tabaco, cv. SR1, obteve 93,7% dos explantes com
12 formação de gemas. Porém, ao elevar a concentração desse regulador de
13 crescimento, um decréscimo na percentagem de explantes que apresentaram
14 regeneração pode ser notado. Em recente estudo, Rout e Saul (2007), observaram
15 que disco foliares de tabaco, cv. Xanthi, quando cultivados em meio com 0,5 mg.L⁻¹
16 de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA, apresentaram um rápido desenvolvimento de gemas.
17 Entretanto, a taxa de regeneração dos explantes apresentou uma redução no
18 número de gemas em concentrações mais elevadas de BAP. Entre os dois tipos de
19 explantes testados, a folha apresentou uma maior capacidade regenerativa.

20 Na ausência de BAP, somente 4% do explantes foliares apresentaram raízes
21 e nenhum outro processo de regeneração foi observado, o que pode ser justificado
22 pela baixa concentração de citocinina endógena, que não foi suficiente para
23 favorecer regeneração de gemas ou brotos neste tipo de tecido. Por outro lado, 34%
24 dos explantes de entrenós apresentaram calos quando cultivados na ausência de
25 reguladores de crescimento. Baixas concentrações de auxinas em combinação com
26 citocininas têm sido reportadas melhorando a diferenciação de gemas de vários tipos
27 de explantes (TSAY; GAU; CHEN, 1989; DAS; ROUT 2002).

28
29
30
31
32
33
34

1



2

3 FIGURA 3. Percentagem de calos e brotos formados em folha de tabaco, cv. 418,
 4 submetidos a diferentes concentrações de BAP. Os dados representam as médias
 5 (+/- erro padrão da média). Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo
 6 teste de Tukey (5%).

7

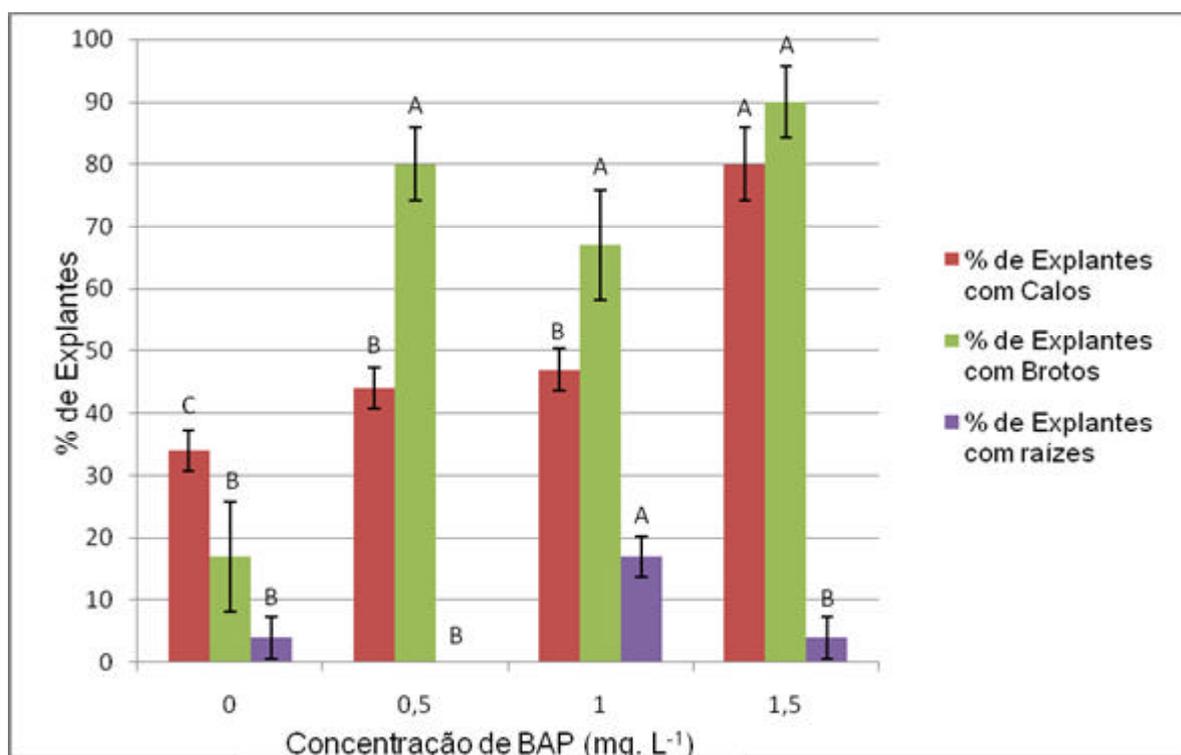
8 Com o aumento da concentração de BAP, ocorreu uma redução no
 9 percentual de explantes foliares com formação de calo, chegando a 4% quando
 10 cultivados com 2mg.L⁻¹. Em contraste, Rout e Saul (2007) quando cultivaram disco
 11 foliares de tabaco (cv. Xanthi) em 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA encontram
 12 presença de calo em 74,6% dos explantes. Em entrenós, o aumento da
 13 concentração desse regulador de crescimento, elevou significativamente o
 14 percentual de explantes com desenvolvimento de calo, 80% deles apresentaram calo
 15 quando cultivados na concentração 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. Por outro lado, em todas as
 16 concentrações testadas nos dois tipos de explantes estudados, a taxa de
 17 sobrevivência foi de 100%, mostrando que não houve influência das diferentes
 18 concentrações utilizadas nesse parâmetro.

19

20

21

1



2

3 FIGURA 4. Percentagem de calos, brotos e raízes em entrenós de tabaco, cv. 418,
 4 submetidos a diferentes concentrações de BAP. Os dados representam as médias
 5 (+/- erro padrão da média). Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo
 6 teste de Tukey (5%).

7

8 Após 30 dias do início do experimento, foi possível observar que o tipo e a
 9 concentração do regulador de crescimento utilizado, afetaram a regeneração dos
 10 explantes.

11 Os avanços da engenharia genética têm possibilitado a obtenção de plantas
 12 geneticamente modificadas. No entanto, para alcançar a eficácia deste processo, se
 13 faz necessário o desenvolvimento de métodos eficientes de regeneração de plantas,
 14 através da cultura de tecidos. Apesar de o tabaco ser amplamente empregado em
 15 diversos experimentos em cultura de tecidos, as respostas dessa planta para
 16 regeneração *in vitro* são altamente variáveis e dependentes do genótipo utilizado
 17 (ANDRADE, 2002; TANG; LUO; LIU, 2008).

18

19

20

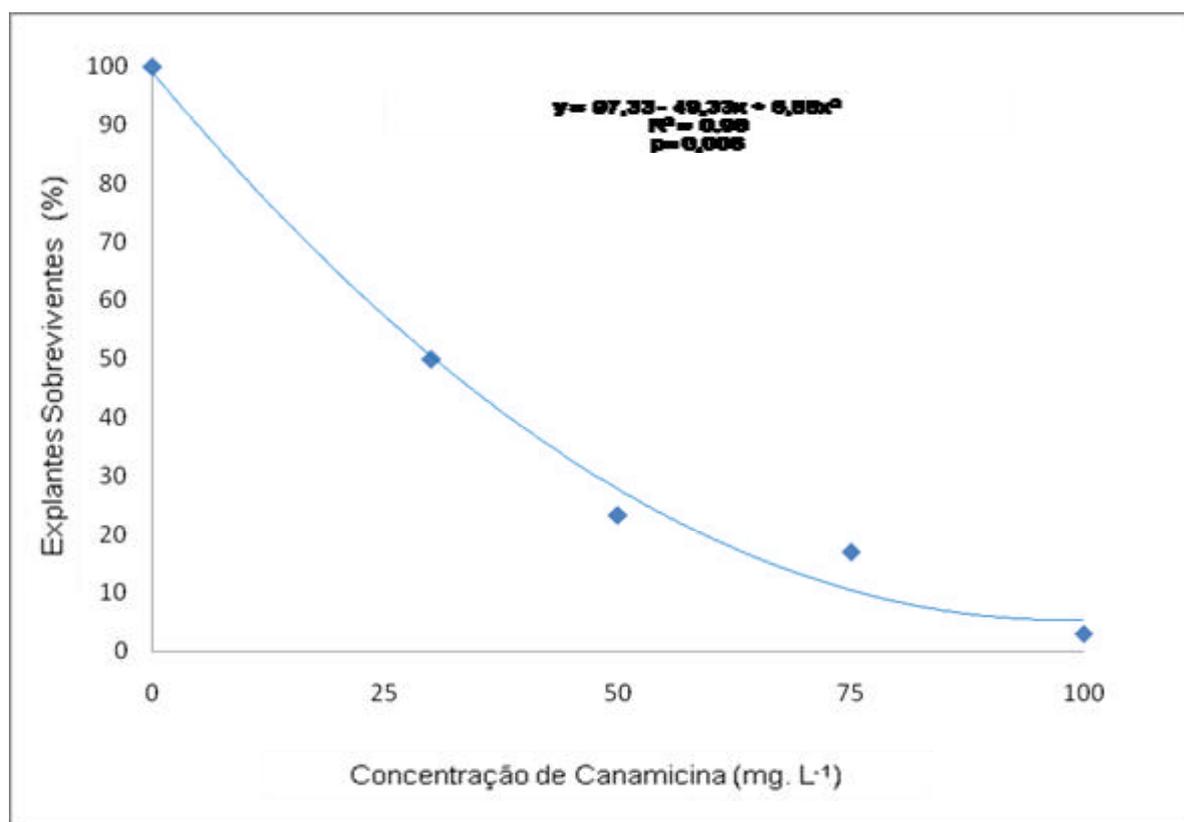
21

1 **5.2 Tolerância dos explantes frente ao agente de seleção**

2 No ensaio de tolerância (folhas e entrenós) ao agente de seleção, foi
3 observado que o tratamento com 30 mg.L⁻¹ de canamicina provocou morte de todos
4 os explantes foliares. Em entrenós, a taxa de sobrevivência diminuiu conforme o
5 aumento da concentração do antibiótico, sendo que em 30 mg.L⁻¹, cerca de metade
6 dos explantes morreram (figura 4); esta mesma concentração foi capaz de inibir
7 totalmente o crescimento e o desenvolvimento de brotos. Diferenças de sensibilidade
8 nos dois tipos de explantes utilizados foram encontradas quando submetidos a
9 mesma concentração do agente de seleção. A formação de raízes nos explantes foi
10 totalmente inibida pela presença do antibiótico em todas as concentrações testadas.
11 Quando os entrenós foram cultivados em 50 mg.L⁻¹, somente 25% sobreviveram
12 apresentando 10% de formação de calo. Esse valor decresce para 6% quando
13 submetido a 75 mg.L⁻¹, não ocorrendo qualquer resposta quando os explantes foram
14 expostos a 100mg.L⁻¹ do antibiótico, mostrando que para a seleção de entrenós da
15 cultivar utilizada no experimento, é necessária essa concentração para se obter uma
16 seleção total. Diferente dos resultados encontrados neste trabalho, Coutinho (2005),
17 verificou que 100 mg.L⁻¹ seria a concentração de antibiótico para uma seleção
18 eficiente de folhas e entrenós. Tais diferenças na sensibilidade têm sido
19 determinadas de acordo com a espécie, genótipos, tipo de explantes
20 (MANICKAVASSAGAM et al., 2004; COSTA et al., 2002; SONG; SING, 2004).

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1



2

3 FIGURA 5. Percentagem de sobrevivência de entrenós de tabaco, cv. 418,
4 submetidos a diferentes concentrações de canamicina.

5

6 A seleção imediata dos tecidos transformados é uma característica desejável
7 dentro do processo de transformação genética. A sensibilidade das células vegetais
8 transformadas é altamente dependente do tipo de explante, espécie, genótipo e do
9 tipo de antibiótico utilizado como agente seletivo (ALSHEIKH et al., 2002).

10

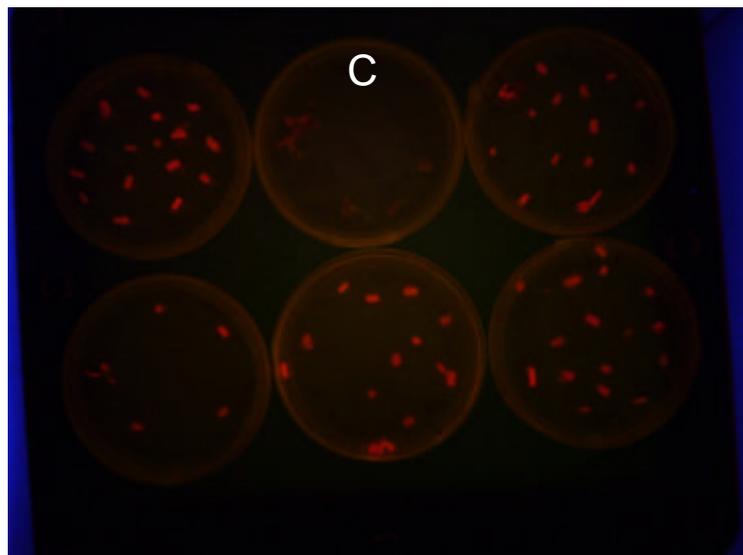
11 **5.3 Transformação com a cepa LBA4404 de *Agrobacterium* com o vetor binário** 12 **pRS037 contendo gene repórter**

13 O ensaio preliminar de transformação avaliou a virulência da cepa LBA4404
14 de *Agrobacterium* na variedade utilizada no estudo. A infecção pela cepa contendo
15 pRS037 para expressão da GFP nos explantes transformados foi avaliada após vinte
16 e um dias do processo de transformação, quando estes foram submetidos à luz UV
17 (figura 6).

18

19

1



2

3 FIGURA 6. Explantes de tabaco, cv. 418, expressando a proteína verde fluorescente
4 (GFP) e explantes não transformados (C), sete dias após o processo de
5 transformação.

6

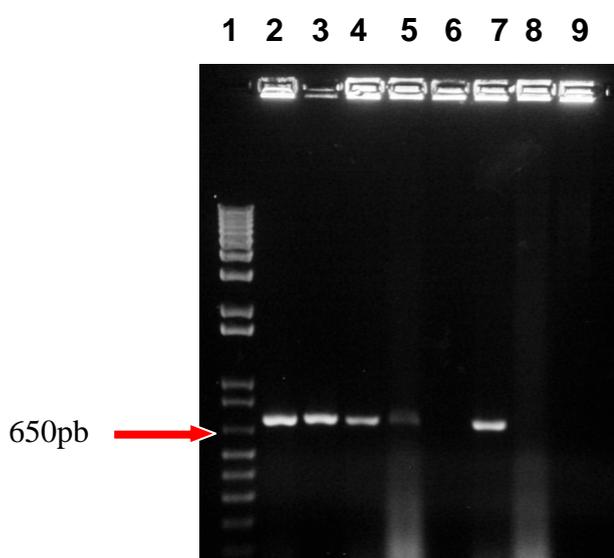
7 Foi possível observar que os entrenós e folhas, expressaram a GFP
8 (evidenciada pela presença de fluorescência emitida pelos explantes), confirmando
9 assim o êxito no processo transformação. De acordo com (ALVES; QUECINI;
10 VIEIRA, 1999), a distinção de células transformadas das não transformadas é uma
11 etapa crucial no processo de transformação. No entanto, o uso de agentes seletivos,
12 frequentemente antibióticos, prejudica a diferenciação celular e desenvolvimento de
13 tecidos a qual foram submetidos ao processo de transformação. Marcadores de
14 expressão como a GFP têm proporcionado uma identificação imediata e segura das
15 células transformadas sem prejudicar o desenvolvimento vegetal. Segundo Slater e
16 colaboradores (2008), a GFP é uma alternativa conveniente para a avaliação de
17 sistema de transformação em plantas, porque além de não precisar de substrato
18 extra, ela é analisada de forma não destrutiva, uma vez que é feita em tecidos vivos.
19 Essa proteína tem sido abordada em vários trabalhos, tais como o estresses
20 abióticos (KIEGLE, et al., 2000), estudos referente a embriogênese em *Arabidopsis*
21 *thaliana* (BERGER et al., 1998), comparação entre promotores (SCHENK et al.,
22 1998), entre outros.

23

1 **5.4 Transformação de *A. tumefaciens* com vetor binário pGA643/*ltb-r1***

2 A introdução do pGA643/*ltb-r1* em células desarmadas de *A. tumefaciens* por
3 choque térmico conforme descrito por Brasileiro et al. (1998) foi realizada com êxito,
4 como se pode observar através da triagem por PCR das colônias recombinantes que
5 apresentaram uma banda do tamanho esperado para *ltb-r1*, aproximadamente 700
6 pb (figura 6). De acordo com Tsuchizaki e colaboradores (2000), a técnica de PCR
7 para triagem de colônias recombinantes tem sido realizada com sucesso para
8 detecção rápida de sequências específicas.

9
10



11

12 FIGURA 7. Triagem das colônias recombinantes de *A. tumefaciens* através de PCR de
13 colônia. Gel de agarose 1,0%. 1. Marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen);
14 2. *ltb-r1* (controle positivo); 3 a 7. Possíveis colônias recombinantes; 8. Colônia não-
15 recombinante; 9. Água (controle negativo).

16

17 Das colônias resistentes aos antibióticos de seleção (canamicina e
18 tetraciclina), uma foi escolhida a partir da confirmação por PCR da presença do gene
19 *ltb-r1*. Não foi observado crescimento em meio seletivo das demais colônias de *A.*
20 *tumefaciens* que não apresentavam o vetor de expressão.

21

22 **5.5 Transformação de plantas de tabaco com vetor binário pGA643/*ltb-r1***

23 A partir da confirmação da eficiência do protocolo descrito por Brasileiro et
24 al. (1998) e da susceptibilidade da cultivar vegetal utilizada à cepa LBA4404 de *A.*
25 *tumefaciens*, realizou-se o processo de transformação com vetor de expressão

1 pGA643/*ltb-r1*. Foram realizados vários eventos de transformação e inúmeros
2 explantes de tabaco submetidos ao co-cultivo com *A. tumefaciens* contendo o vetor
3 para expressão do gene *ltb-r1*, possibilitando assim obter um maior número de
4 transformantes. Apesar do aumento de explantes utilizados na transformação, um
5 baixo nível de regeneração foi obtido quando estes foram submetidos ao meio
6 seletivo (figura 7). Maior número de transformantes tem sido alcançado pelo
7 aumento de eventos de transformação (SHRAWAT, BECKER; LÖRS, 2007). Além
8 disso, a escolha do antibiótico e sua concentração é um importante passo no
9 processo seletivo, pois estes não devem ser tóxicos às plantas a ponto de impedir
10 seu desenvolvimento (OGAWA; MII, 2007).

11



12

13 FIGURA 8. Entrenós putativamente transformados de tabaco, cv. 418, submetidos
14 ao meio seletivo.

15

16 Uma vez, mostrado um bom desenvolvimento e enraizamento *in vitro*, as
17 plantas que sobreviveram à seleção, foram transferidas com sucesso para a casa de
18 vegetação, sob ambiente controlado para posteriores análises moleculares (figura 9).

19

20

21

22

23

24

25

26

1



2

3 FIGURA 9. Aclimatização em casa de vegetação de plantas de *N. tabacum*, cv. 418,
4 PCR positivas para o gene *ltb-r1*.

5

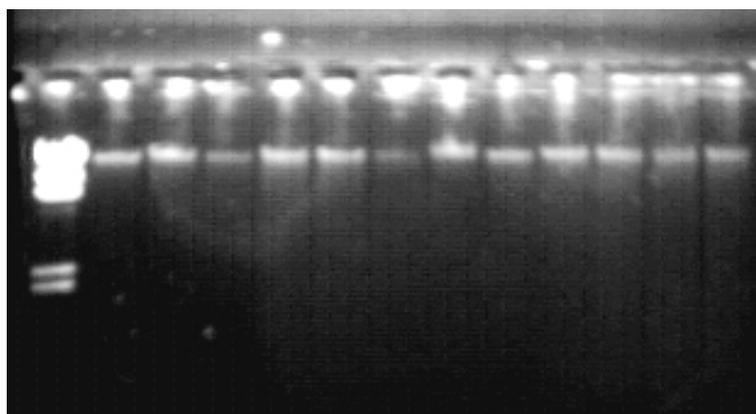
6 5.6 Extração do DNA e PCR para confirmação da transformação

7 O DNA genômico de tabaco foi extraído de plantas submetidas ao processo
8 de transformação genética (possíveis transformantes) e plantas não transformadas
9 (controle). Foi possível observar altas concentrações de DNA além de um baixo nível
10 de degradação (figura 8).

11

12

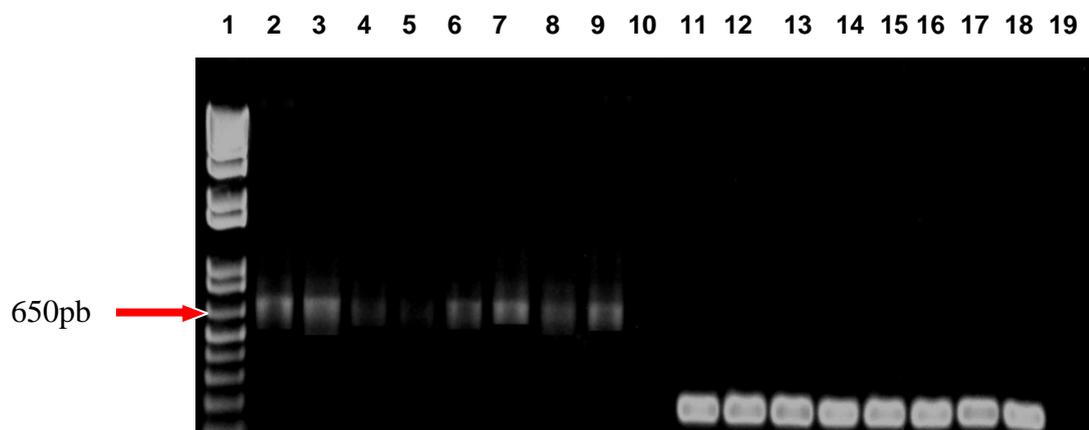
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



13

14 FIGURA 10. DNA genômico de tabaco, cv. 418. Gel de agarose 1,0%. Marcador de
15 peso molecular fago ? digerido com *HindIII* (Invitrogen); 2. Planta não transformada
16 (controle negativo); 3 a 13. Plantas com resistência ao agente de seleção (possíveis
17 transformantes).

1 A partir da obtenção de DNA genômico foi realizada a técnica de PCR para
2 amplificação do gene *ltb-r1*. Na figura 9, observa-se a amplificação por PCR do gene
3 *ltb-r1*, fragmento de ~700 pb, confirmando a presença do gene de interesse no
4 genoma vegetal.

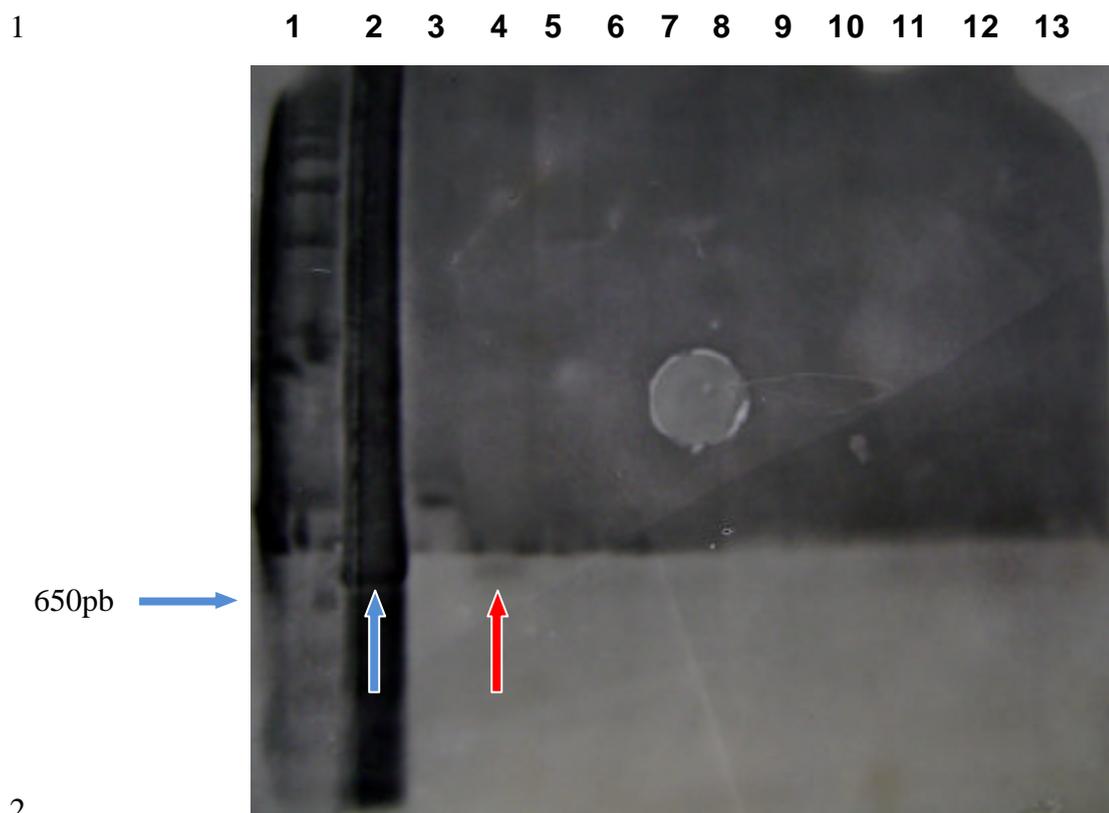


8 FIGURA 11. Amplificação do gene *ltb-r1* e 18s em gel de agarose 1,0%. 1. Marcador
9 de peso molecular 1 kb plus ladder (Invitrogen); 2 a 9. Plantas transformadas
10 apresentando fragmento de ~700 pb (*ltb-r1*); 10. Planta não transformada; 11 a 18.
11 Controle positivo da reação, amplificação do gene 18s; 19. Controle negativo da
12 reação (água).

15 5.7 Southern blot

16 A partir da técnica “*Southern blot*”, foi possível observar a integração do
17 gene no genoma vegetal com presença de uma banda de ~700 pb nas plantas
18 transformadas. Verificou-se uma banda mais intensa em uma das plantas (seta
19 vermelha) comprovando a integração de cópias do gene *ltb-r1* no genoma vegetal
20 (figura 10).

21
22
23
24
25
26
27
28



3 FIGURA 12. Filme de Raio-X obtido a partir da técnica “Southern blot”. 1. 1kb plus
4 (Invitrogen); 2. Fragmento *ltb-r1* (sonda); 3. Plasmídeo pGA643/*ltb-r1*; 4 a 12.
5 Possíveis plantas transformantes; 13. Planta não transformada.

6

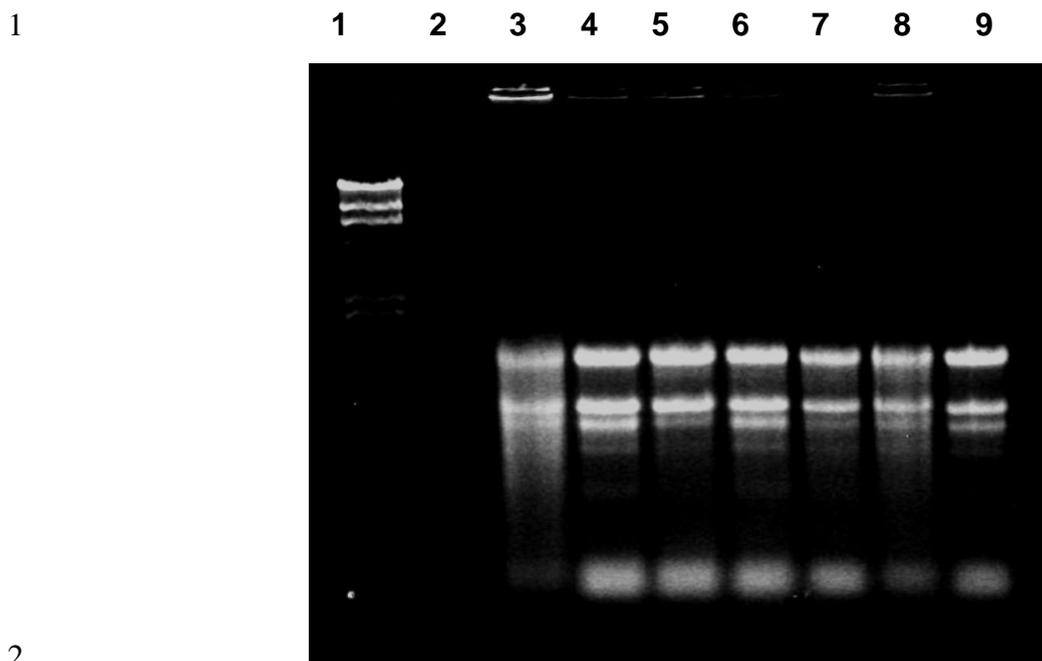
7 De acordo com Travella e colaboradores (2005), os mecanismos de
8 transferência do T-DNA utilizado por *A. tumefaciens* apresentam um padrão de
9 integração de poucas cópias (geralmente cópia única) do gene de interesse ao DNA
10 vegetal, resultando assim, em uma redução de ocorrência do silenciamento gênico,
11 que é frequente, em outras metodologias tal como biobalística, onde, geralmente,
12 várias cópias gênicas são integradas ao genoma vegetal. Além disso, a integração
13 ocorre sem maiores rearranjos gênicos (TORRES, DUSI, SANTOS, 2007).

14

15 5.8 RNA

16 Após a confirmação da integração do gene *ltb-r1* no genoma vegetal, foi
17 realizada a extração do RNA total de folhas jovens de tabaco utilizando o reagente
18 Concert® (Invitrogen) para posterior realização da técnica RT-PCR (transcriptase
19 reversa). Observou-se a presença de três bandas mais intensas referentes aos
20 diferentes tipos existentes de RNA (figura 11).

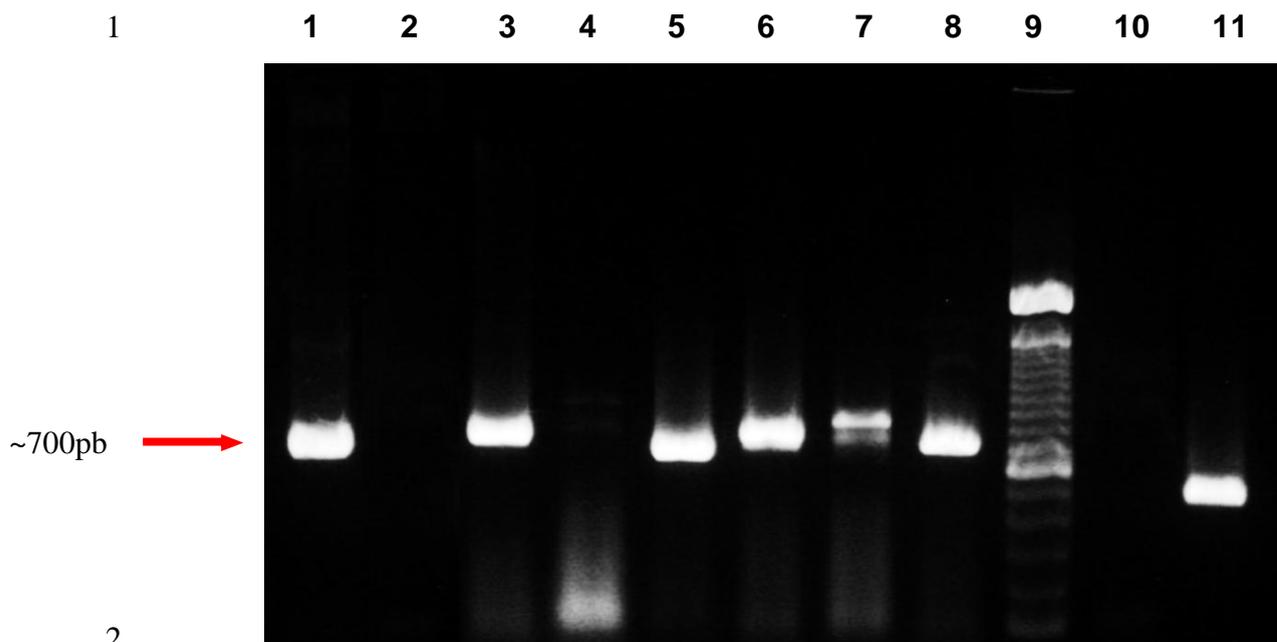
21



2
3 FIGURA 13. Extração de RNA total. Gel de agarose 1,0%. 1. Marcador de peso
4 molecular fago ? digerido com *HindIII* (Invitrogen); 2. Controle negativo (água); 3.
5 Planta não transformada; 4 a 9. Plantas transformadas.

6
7 O resultado obtido na RT-PCR pode ser observado na figura 12. A
8 sequência de *primers* para CAT resultou no produto de aproximadamente 500pb,
9 confirmando o êxito da reação. Já a sequência de *primers* para amplificação do gene
10 *Itb-r1*, gerou um fragmento de ~700 pb nas plantas transformadas, confirmando
11 assim, a transcrição do gene. Não houve presença de nenhuma banda no produto
12 da RT-PCR da planta não transformada (figura 12, coluna 2). De acordo com Chelly
13 e Kahn (1994), a técnica RT-PCR é capaz de determinar a expressão de um agente
14 em um organismo, mesmo em caso de genes com baixa expressão e vem sendo
15 utilizada com sucesso na avaliação da expressão de diversos tecidos.

16
17
18
19
20
21
22
23



2
3 FIGURA 14. Amplificação de *ltb-r1* e CAT por RT-PCR. Gel de agarose 1%. 1.
4 pGA643/*ltb-r1* (controle positivo); 2. Planta não transformada (controle), amplificação
5 de *ltb-r1*; 3 à 8. Amplificação do *ltb-r1* das possíveis plantas transformadas; 9.
6 Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen); 10. Controle negativo
7 da RT-PCR (água); 11. Controle positivo da RT-PCR, CAT (500 pb).

8

9 5.9 Extração de proteínas e SDS-Page

10 As plantas transformadas que amplificaram a sequência *ltb-r1* na reação de
11 RT-PCR foram submetidas à extração proteica. As proteínas totais extraídas pelo
12 protocolo descrito por Brasileiro et al. (1998), foram obtidas com sucesso. A
13 concentração proteica variou de 1,68 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ à 3,29 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Objetivando concentrar as
14 proteínas, foi realizada a técnica de concentração por acetona. Resultados mais
15 expressivos foram observados após esta concentração. Posteriormente, as proteínas
16 foram submetidas à SDS-Page (eletroforese de proteínas) e coradas com Comassie
17 Blue (figura 13).

18

19

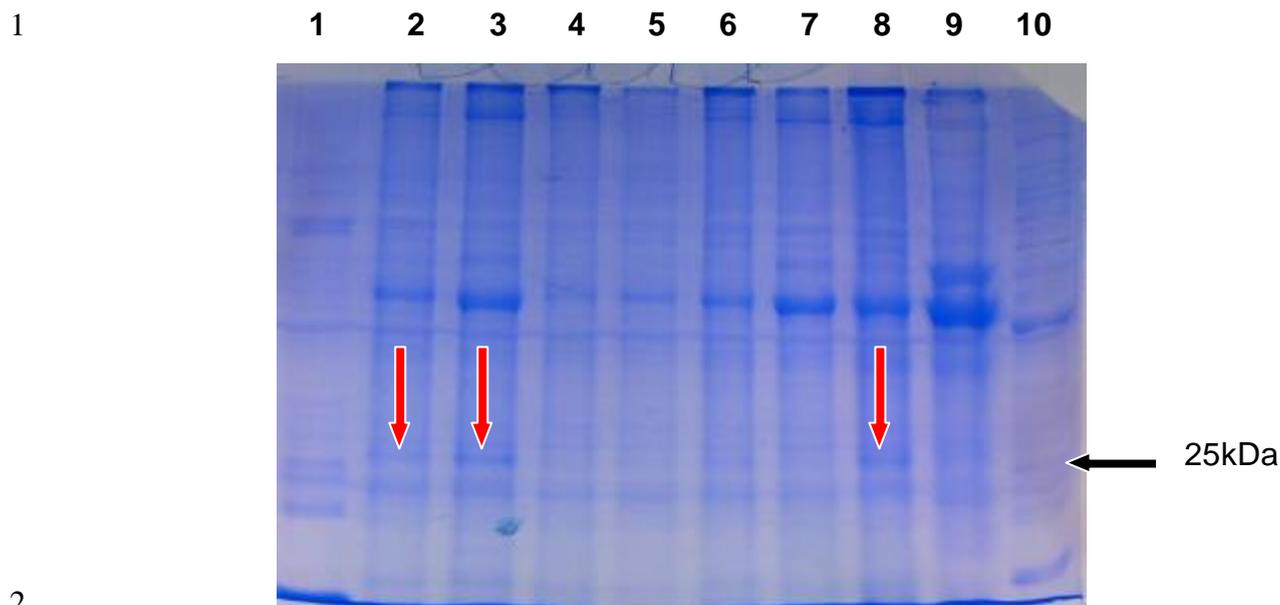
20

21

22

23

24



3 FIGURA 15. SDS-Page 12%. 1. Proteína rLTB-R1 (controle positivo); 2 à 8. Plantas
4 transformadas; 9. Planta não transformada (controle negativo); 10. Marcador
5 Benchmarker Protein (Invitrogen).

6

7 Além disso, observou-se a presença de uma banda com o tamanho
8 esperado (25 kDa) nas plantas transformadas (setas vermelhas), possivelmente
9 referente a proteína LTB-R1. A proteína purificada LTB-R1 de *E. coli* apresentou
10 diversas bandas ao decorrer do gel. De acordo com Conceição (2005), a LTB que é
11 formada por homopentâmeros, é capaz de alterar sua migração quando submetido à
12 eletroforese produzindo mais que uma banda no gel de poliacrilamida. Já na planta
13 não transformada, apesar de apresentar uma maior concentração proteica
14 (visualizada pela intensidade das bandas), não houve presença de uma possível
15 banda referente à LTB-R1.

16

17 5.10 Western blotting

18 A partir da SDS-Page foi possível realizar a detecção imunológica utilizando
19 a técnica “*Western blotting*”. Utilizaram-se apenas anticorpos para LTB (anti-CT e
20 anti-coelho). Mas estes não foram suficientes para detectar a presença da proteína
21 LTB-R1 (Figura 14). Então, passou-se a utilizar as proteínas concentradas e
22 anticorpos para R1 (F1B6) além dos anticorpos para LTB (que já eram utilizados).
23 Ainda assim, não se pode observar com precisão a formação de uma banda
24 referente à proteína LTB-R1 nas plantas transformadas.

1 De acordo com os resultados obtidos é possível levantar duas principais
2 hipóteses. A primeira é que a proteína recombinante está sendo produzida em
3 quantidades baixas, ou seja, um pequeno nível de expressão não está sendo capaz
4 de ser detectado pela técnica “*Western blotting*”, pois é possível afirmar que a
5 transcrição ocorre de acordo com os resultados obtidos na técnica RT-PCR.



8

9 FIGURA 16. Hibridização de proteínas em membrana de nitrocelulose (*Western*
10 *blotting*), utilizando-se apenas anti-CT. 1. Controle positivo, proteína LTB-R1; 2.
11 Proteína total da planta não transformada; 3 a 8. Proteína das plantas
12 transformadas.

13

14 Conforme é descrito na literatura (KOPROWSKI; YUSIBOV, 2001; MA;
15 DRAKE; CHRISTOU, 2003; SALA et al., 2003; TWYMAN et al., 2003; TACKET et al.,
16 2004; SCHILLBERG et al., 2005; KIM et al., 2007), embora a produção de biomassa
17 em algumas espécies vegetais seja elevada, a expressão de genes exógenos
18 inseridos em plantas é muitas vezes baixa, representando apenas 0,1 a 0,4% do
19 total de proteínas solúveis no vegetal. Segundo Jasin e colaboradores (1996), o local
20 de integração do gene exógeno no genoma e ainda o número presente de cópias,
21 podem ter efeitos significativos sobre expressão gênica. O DNA exógeno é integrado
22 no genoma como subproduto da quebra cromossômica por mecanismos de
23 reparação, o que proporciona sua inclusão em locais aleatórios podendo assim
24 dificultar a expressão (KUMANR; FLADUNG, 2001). Um grande número de fatores
25 em casos de transformação tem sido responsáveis pela modulação da expressão

1 gênica incluindo a escolha certa do promotor, sinais de poliadenilação, uso do sinal
2 de retenção do retículo endoplasmático, entre outros (SALA et al., 2003). Para
3 superar tais dificuldades, outras técnicas de transformação têm sido empregadas, tal
4 como a utilização de vetores virais que tem sido foco de diversos trabalhos que
5 visam elevar níveis de expressão e estabilidade da proteína produzida (DANIELL;
6 MUTHUKUMAR; LEE, 2001; CARTER; LANGRIDGE, 2002; KOPROWSKI;
7 YUSIBOV, 2001).

8 Outra hipótese da ausência da proteína recai sobre mecanismos de defesa e
9 etapas pós-transcricionais. Sabe-se que as plantas possuem mecanismos de defesa
10 contra diversos tipos de agentes, tais como vírus ou ainda genes exógenos, que
11 promovem o silenciamento gênico pós-transcricional. A primeira função biológica
12 proposta para o silenciamento de RNA foi identificada em vegetais quando
13 experimentos sobre a resistência derivada do patógeno foram realizados (AL-KAFF
14 et al., 1998, COVEY et al., 1997). Além da defesa contra infecção por vírus, o
15 silenciamento de RNA também está envolvido na proteção contra a transposição de
16 DNA sugerindo que este mecanismo funcionaria como um “sistema imune” do
17 genoma envolvendo uma série de processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos
18 na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional (ZERBINI; ALFENAS;
19 ANDRADE, 2005). Evidências mostram que esse mecanismo ocorre nas regiões
20 codificadoras que ficam sujeitas a metilações e hidrólise de mRNAs produzidos de
21 maneiras incorretas (GRANT, 1999; SLATER; SCOTT; FOWLER, 2008). Ainda,
22 outro mecanismo chamado de co-supressão, tem sido reportado em processos de
23 transformação. Ele consiste de degradação de um mRNA por esse apresentar
24 homologia a outro gene presente no genoma da planta impedindo assim a produção
25 da proteína (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999; KUMANR; FLADUNG, 2001). Alguns
26 fatores na estrutura dos transgenes têm sido relacionados a problemas na expressão
27 em plantas. O alto conteúdo de A+T dos genes bacterianos tem sido uma das
28 explicações, uma vez que esses são identificados como sendo de origem exógena
29 ao genoma vegetal. Além disso, a presença de sequências (AUUUA) podem
30 desestabilizar o mRNA que é reconhecido em algumas regiões erroneamente como
31 sendo um sinal de poliadenilação ou íntron vegetal (GRANT, 1999; SLATER;
32 SCOTT; FOWLER, 2008).

33

1 Baixos níveis de expressão de LTB e CTB têm sido encontrados em tomate
2 (WALMSLEY et al., 2003), tabaco (DANIELL, et al., 2001), milho (CHIKWAMBA et
3 al., 2002) impossibilitando o desenvolvimento em escala comercial dessas plantas.
4 Em alguns casos, o baixo nível de expressão acaba sendo um fator limitante no uso
5 desses sistemas. A utilização de outras espécies para expressão de antígenos como
6 a soja, principalmente por apresentar elevado teor proteico, tem se mostrado
7 promissora, gerando respostas em nível sistêmico e secretório quando administrada
8 oralmente em animais (KONG et al., 2001; WALMSLEY; ARNTZEN, 2000;
9 MORAVEC et al., 2007).

10 Apesar do baixo percentual de expressão, algumas vantagens como
11 processos de transformação já estabelecidos, vasto conhecimento do genoma, além
12 de sua alta produtividade, tornam o tabaco uma das plantas mais utilizadas na
13 expressão heteróloga de diversas proteínas. Inúmeros são os fatores que podem
14 influenciar a produção da proteína em questão, impossibilitando assim, a descoberta
15 da sua ausência ou baixa produção. Algumas alternativas como a inclusão de
16 sequências específicas utilizadas em plantas, à jusante do códon inicial de tradução,
17 têm sido reportadas promovendo uma melhor estabilidade no processo de tradução
18 (FRANG et al., 1989; GRANT, 1999; SLATER; SCOTT; FOWLER, 2008). A alteração
19 do “codon usage” (para o utilizado em plantas) tem resultado na obtenção de
20 proteínas mais estáveis (PERLAK et al., 1991). Ainda, o uso de recombinases sítio-
21 específico tem sido uma alternativa para integração com sucesso de transgenes,
22 uma vez que plantas não possuem um sistema endógeno eficiente de recombinação
23 (IIDA; TERADA, 2005).

24 Outras espécies vegetais como a soja, alface, tomate podem ser testadas
25 como biorreatores utilizando inúmeras proteínas vacinais, uma vez que já é
26 conhecido o grande potencial dessas plantas em diversos modelos de expressão.

27

28

29

30

31

1 **6.0 CONCLUSÃO**

2 A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que a
3 utilização de tabaco, cv. 418, como modelo vegetal para transformação genética,
4 possibilita a integração e transcrição do gene responsável para produção da quimera
5 LTB-R1, embora não tenha sido possível detectar com precisão, através dos testes
6 utilizados, a proteína recombinante.

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KAFF, N. S.; COVEY, S. N.; KREIKE, M. M.; PAGE, A. M.; PINDER, R.; DALE, P. J. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. **Science**, v. 279, p. 2113-2115, 1998.

ALSHEIKH, M. K.; SUSO, H. P.; ROBSON, M.; BATTEY, N. H.; WETTEN, A. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1173-1180, 2002.

ALVES, A.; QUECINI, V.; VIEIRA, M. Plant transformation: advances and perspectives. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 1-8, 1999.

ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. EMBRAPA, **Documento 58**. 2002.

ANDRADE, G. M. de; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* SSP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 465-475, 2003.

BERGER, F.; HASELOFF, J.; SCHIEFLBEIN, J.; DOLAN, L. Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries. **Current Biology**, v. 8, p. 421-430, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. Cultivo e Conservação de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 309, 1998.

BRASILEIRO, A.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 309p, 1998.

BUSO, J, A. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. v. 2, p. 653-677, 1999.

- 1 CARTER, J. E.; LANGRIDGE, W. H. R. Plant-based vaccines for protection against
2 infectious and autoimmune diseases. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p.
3 93–109, 2002.
- 4
- 5 CHELLY, J.; KAHN, A. RT-PCR and m-RNA quantitation. In: PCR, **The polymerase**
6 **chain reaction**. In: MULLIS, K. B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. A. Boston: Birkhauser, v.
7 1, p. 97-110, 1994.
- 8
- 9 CHEN, J. R.; LIAO, C. W.; MAO, C. N. W. A recombinant chimere composed of
10 repeat region R1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas*
11 *exotoxin*: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary**
12 **Microbiology**, v. 80, p. 347-357, 2001.
- 13
- 14 CHIKWAMBA, R.; CUNNICK, J.; HATHAWAY, D.; MCMURRAY, J.; MASON, H.;
15 WANG, K. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects
16 mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT).
17 **Transgenic Research**, v.11, p. 479–493, 2002.
- 18
- 19 CID, L. P. B. Suspensão celular. In: Torres TORRES, A. C.; CALDAS, L, S.; BUSO,
20 J, A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1, p. 331-353,
21 1998.
- 22
- 23 CITOVSKY, V. ; KOZLOVSKY, S. V. ; LACROIX, B. ; ZALTSMAN, A.; DAFNY-
24 YELIN, M.; VYAS, S.; TOVKACH, A.; TZFIRA, T. Biological systems of the host cell
25 involved in *Agrobacterium infection*. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 9-20, 2007.
- 26
- 27 CONCEIÇÃO, F. R. **Produção e avaliação de uma vacina de subunidade**
28 **recombinante contra a pneumonia enzoótica suína**. Pelotas, 2005. 7-20p. Tese
29 de Doutorado em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas,
30 Universidade Federal de Pelotas.
- 31
- 32 COSTA, M. G. C.; OTONI, W. C.; MOORE, G. A. An evaluation of factors affecting
33 the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.)

- 1 and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. **Plant**
2 **Cell Reports**, v. 21, p. 365-373, 2002.
- 3
- 4 COUTINHO, C. M. **Regeneração e infecção por *Agrobacterium tumefaciens* em**
5 **explantos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. SR1**. Pelotas, 2005. 66p.
6 Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de
7 Pelotas, Universidade Federal de Pelotas.
- 8
- 9 COVEY, S. N.; AL-KAFF, N. S.; LANGARA, A.; TURNER, D. S. Plants combat
10 infection by gene silencing. **Nature**, v. 385, p. 781-782, 1997.
- 11
- 12 DANIELL, H., STREATFIELD, S.J. & WYCOFF, K. Medical molecular farming:
13 production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccine in plants. Trends in
14 **Plant Science**, v. 5, p. 219-226, 2001.
- 15
- 16 DANIELL, H.; LEE, S. B.; PANCHAL, T.; WIEBE, P. O. Expression of the
17 native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in
18 transgenic tobacco chloroplasts. **Journal of Molecular Biology**, v. 311, p. 1001–
19 1009, 2001.
- 20
- 21 DAS, G.; ROUT, G. R. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago*
22 species, **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 68, p. 311-314, 2002.
- 23
- 24 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of
25 fresh leaf tissue, **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- 26
- 27 DUNG, T.; DUC, L.; HO, N.; UYEN N. *Agrobacterium*-mediated transformation of
28 CRY1Ac gene to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and evaluation of *Heliothis armigera*
29 resistance. **Proceedings of International Workshop on Biotechnology in**
30 **Agriculture**, 2006.
- 31
- 32 FAGAN, P. K.; DJORDJEVIC, S. P.; CHIN, J.; EAMENS, G. J.; WALKER, M. J. Oral
33 immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aro A expressing a

- 1 recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). **Infection Immunity**, v.
2 65, p. 2502-2507, 1997.
- 3
- 4 FERREIRA, M. E.; CALDAS, L, S.; PEREIRA, E, A. Aplicações da cultura de tecidos
5 no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L, S.; BUSO, J,
6 A. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. v. 1, p. 21-42, 1998.
- 7
- 8 FILHO, N. D.; CASCARDO, J. C. de M.; FONTES, E. P. B. Aplicações da cultura de
9 tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L, S.;
10 BUSO, J, A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas.
11 **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**, 1998.
- 12
- 13 FISCHER, R.; LIAO, Y.C.; HOFFMANN, K.; SCHILLBERG, S.; EMANS, N. Molecular
14 farming of recombinant antibodies in plants. **Biol. Chemical**, v. 380, p. 825-839,
15 1999.
- 16
- 17 FISHER, R; EMANS, N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. **Transgenic**
18 **Research**, v. 9, p. 279-299, 2000.
- 19
- 20 FRANG, R. X.; NAGY, F.; SIVASUBRAMANIAM, S.; CHUA, N. H. Multiple *cis*
21 regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic vírus 35S in
22 transgenic plants, **Plant cell**, v. 1, p. 141-150, 1989.
- 23
- 24 GAMA, M. I. C.; CORDEIRO, A. R.; CANTLIFFE, D. J. Transgenic sweetpotato
25 plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Plant Cell**
26 **Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 237-244, 1996.
- 27
- 28 GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology behind the
29 “gene-jockeying” tool. **Mycrobiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 16-
30 37, 2003.
- 31
- 32 GIDDINGS, G. Transgenic plants as protein factories. **Current Opinion in**
33 **Biotechnology**, v.12, p. 450-454, 2001.
- 34

- 1 GRANT, S. R. Dissecting the mechanisms of post-transcriptional gene silencing:
2 divide and conquer. **Cell**, v. 96, p. 303-306, 1999.
- 3
- 4 GRAY, D. J.; MC COLLEY, D. W.; COMPTON, M. E. High-frequency somatic
5 embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. **Journal**
6 **of the American Society for Horticultural Science**, v. 118, p. 425-432, 1993.
- 7
- 8 HAMILTON, A.; BAULCOMBE, D. A species of a small antisense RNA in
9 Posttranscriptional Gene silencing in Plants. **Science**, v. 286, p. 250-252, 1999.
- 10
- 11 HIATT, A.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic
12 plants. **Nature**, v. 342, p. 76-78, 1989.
- 13
- 14 HOOD, E. E.; WOODARD, S. L.; HORN, M. E. Monoclonal antibody manufacturing in
15 transgenic plants - myths and realities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.
16 630-635, 2002.
- 17
- 18 HOUDEBINE, L.M. Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons
19 with other systems. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 625-629, 2002.
- 20
- 21 HSU, T.; ARTIUSHIN, S.; MINION, F.C. Cloning and functional analysis of the P97
22 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of**
23 **Bacteriology**, v. 179, p. 1317-1323, 1997.
- 24
- 25 HUANG, J.; ROZELLE, S.; PRAY, C.; WRANG, Q. Plants biotechnology in China.
26 **Science**, v. 295, p. 674-676, 2002.
- 27
- 28 IIDA, S.; TERADA, R. Modification of endogenous natural genes by gene targeting in
29 rice and other plants. **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 205-219, 2005.
- 30
- 31 JAMES, C. Executive summary of global status of commercialized Biotech/ GM
32 Crops: 2006. **ISAAA**, Briefs, Ithaca, n. 35, 2006.
- 33

- 1 JASIN, M.; MOYNAHAN, M. E.; RICHARDSON, C. Targeted transgenesis.
2 **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 93, p. 8804-8808, 1996.
- 3
- 4 KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e
5 tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L, S.; BUSO, J, A. **Cultura de**
6 **Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 2, p. 519-531, 1999.
- 7
- 8 KIEGLE, E.; GILLIHAM, M.; HASELOFF, J.; TESTER, M. Hyperpolarisation-
9 activated calcium currents found only in cells from the elongation zone of *Arabidopsis*
10 *thaliana* roots. **The Plant Journal**, v. 22, p. 225-229, 2000.
- 11
- 12 KIM, T.; KIM, M.; KIM, G. et al. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-
13 labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). **Protein**
14 **Expression and Purification**, v. 51, p. 22-27, 2007.
- 15
- 16 KONG, Q.; RICHTER, L.; THANAVALA, Y.; YU, F.; ARNTZEN, C. J.; MASON, H. S,
17 et al. Oral immunisation with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic
18 plants. **PNAS**, v. 98, p. 11539–11544, 2001.
- 19
- 20 KOPROWSKY, H.; YUSIBOV, V. The green revolution: plants as heterologous
21 expression vectors. **Vaccine**, v. 19, p. 2735–2741, 2001.
- 22
- 23 KOST, T. A.; CONDREAY, J.P. Recombinante baculoviruses as expression vectors
24 for insect and mammalian cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p. 428-
25 433, 1999.
- 26
- 27 KRIKORIAN, A. D; BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of
28 Haberlandt. **Botanical review**, v. 35, p.59-88, 1969.
- 29
- 30 KUMANR, S.; FLADUNG , M. Controlling transgene integration in plants. **Trends**
31 **Plant Science**, v. 6, p. 155-159, 2001.
- 32
- 33 LARRICK, J. W.; THOMAS, D. W. Producing proteins in transgenic plants and
34 animals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 411-418, 2001.

- 1 LARRICK, J. W.; YU, L.; NAFTZGER, C.; JAISWAL, S.; WYCOFF, K. Production of
2 secretory IgA antibodies in plants. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 87-94, 2001.
3
- 4 LILJEQVIST, S.; STAHL, S.; ANDRÉONI, C. Fusions to the cholera toxin B subunit:
5 influence on pentamerization and GM1 binding. **J. Immunological Methods**, v. 210,
6 p. 125-135, 1997.
7
- 8 LIN, J. H.; WENG, C. N.; LIAO, C. W.; YEH, K. S.; PAN, M. J. Protective effects of
9 oral microencapsuled *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray
10 drying method. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 65, p. 69-74, 2003.
11
- 12 MA, J. K.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant
13 pharmaceutical proteins in plants. **Nature**, v. 4, p. 794 – 805, 2003.
14
- 15 MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat**, sistema para análise estatística
16 para Windows. Versão 2.0. Pelotas: UFPel/NIA, 2003.
17
- 18 MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A.; ANBAZHAGAN, V. R.; SUDHAKAR, B.;
19 SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A.; KASTHURIRENGAN. *Agrobacterium*-mediated
20 genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane
21 (*Saccharum species* hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 134-
22 143, 2004.
23
- 24 MCGHEE, J. R.; MESTECKY J.; DERTZBAUGH, M. T.; ELDRIDGE J. H.;
25 HIRASAWA, M.; KIYONO, H. The mucosal immune system: from fundamental
26 concepts to vaccine development. **Vaccine**, v. 10, p. 75-88, 1992.
27
- 28 MORAVEC, T.; SCHIMIDT, M. A.; HERMAN, E. M.; WOODFORD-THOMAS, T.
29 Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soy bean seed and
30 analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 1647-1657,
31 2007.
32
- 33 MUNYIWA, T. R.I; RAEMAKERS, K. C. J. M.; SCHREUDER, M.; KOK, R.;
34 SCHIPPERS, M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Pipointing towards improved

- 1 transformation and regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant**
2 **Science**, v. 13, p. 87-101, 1998.
- 3
- 4 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with
5 tobacco tissue cultures. **Physiological Plant**. v. 15, p. 473-497, 1962.
- 6
- 7 OBOEGBULEN, S.I. Enzootic pneumonia of pigs: a review. **Bulletin of Animal**
8 **Helth**, v. 29, p. 269-274, 1981.
- 9
- 10 OGAWA, Y.; MII, M. Meropenem and moxalactam: Novel b-lactam antibiotics for
11 efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Science**, v. 172, p. 564–
12 572, 2007.
- 13
- 14 OIEN, N. L.; BRIDEAU, R. J.; WALSH, E. E.; WATHEN, M. W. Induction Of Local
15 And Systemic Immunity Against Human Respiratory Syncytial Virus Using A Chimeric
16 Fg Glycoprotein And Cholera-Toxin B-Subunit. **Vaccine**, v. 12, p. 731-735, 1994.
- 17
- 18 PERLAK, F. J.; FUCHS, R. L.; DEAN, D. A.; MCPHERSON, S. L.; FISCHOFF, D. A.
19 Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control
20 protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 3324–
21 3328, 1991.
- 22
- 23 RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of
24 mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 1094, 1998.
- 25
- 26 ROMMENS, C. Kanamycin resistance in plants: an unexpected trait controlled by a
27 potentially multifaceted gene. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 317-319, 2006.
- 28
- 29 ROUT, G. R.; SAHOO, S. In vitro selection and plant regeneration of copper-tolerant
30 plants from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. **Plant Breeding**. v. 126,
31 p. 403-409, 2007.
- 32
- 33 RYBICKI, E. P. Plant-produced vaccines: promise and reality. **Drug Discovery**
34 **Today**, v. 14, p. 16-24, 2009.

- 1 SALA, F.; RIGANO, M.; BARBANTE, A. et al. Vaccine antigen production in
2 transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. **Vaccine**, v. 21, p.
3 803-808, 2003.
- 4
- 5 SANTARÉM, E. R. **Métodos eficientes para transformação genética de plantas.**
6 <http://www.unimep.br/phpg/editora/revistaspdf/rct15art10.pdf>, acesso em 20 jan.
7 2010.
- 8
- 9 SCHENK, P.; ELLIOT, A.; MANNERS, J. Assessment of transient gene expression
10 in plant tissues using green fluorescent protein as a reference. **Plant Molecular**
11 **Biology Reporter**, v. 16, p. 313-322, 1998.
- 12
- 13 SCHILLBERG, S; TWYMAN, R.; FISCHER, R. Opportunities for recombinant
14 antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment.
15 **Vaccine**, v. 23, p. 1764–1769, 2005.
- 16
- 17 SHENG, J.; CITOVSKY, V. Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence
18 proteins, will travel. **The Plant cell**, v. 8, p. 1699-1710, 1996.
- 19
- 20 SHRAWAT, A.; BECKER, D.; LÖRS, H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated
21 genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v. 172,
22 p. 281–290, 2007.
- 23
- 24 SLATER, A.; SCOTT, N. W.; FOWLER, M. R. **Plant Biotechnology**. New York:
25 Oxford University Press. 396p, 2008.
- 26
- 27 SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N., et al. Pneumonia enzoótica. In:
28 **Clínica e Patologia Suína**. 2ª ed., Art. 3, Impressos Especiais, Goiânia, Goiás,
29 p.359, 1999.
- 30
- 31 SONG, G. Q.; SING, K. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of
32 blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 475-484, 2004.
- 33

- 1 STEVENSON, G.W. Bacterial pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG
2 VETERINARY SOCIETY CONGRESS, **Proceedings... Birmingham: IPVS**, v. 15,
3 p. 906- 907, 1998 (Abstract).
4
- 5 STOGER, E.; VAQUERO, C.; TORRES, E.; SACK, M.; NICHOLSON, L.;
6 DROSSARD, J.; WILLIAMS, S.; KENN, D.; PERRIN, D.; CHRISTOU, P.; FISCHER,
7 R. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical
8 antibodies. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 583-590, 2000.
9
- 10 STREATFIELD, S. J. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral
11 vaccines. **Methods: Methods in Mucosal Immunisation**, v. 38,p. 150-157, 2006.
12
- 13 STREATFIELD, S. J. Approaches to achieve high-level heterologous protein
14 production in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 2-15, 2007.
15
- 16 TACCHINI, P.; WALBOT, V. Transformation of plants. **Nestlé Research News**. p.19-
17 29, 1986.
18
- 19 TANG, H.; LUO, Y.; LIU, C. Plant regeneration from *in vitro* leaves of four commercial
20 *Pyrus* species. **Plant soil environment**, v. 54, p. 140-148, 2008.
21
- 22 THACKET, C.; PASETTI, M.; EDELMAN, R. et al. Immunogenicity of recombinant
23 LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. **Vaccine**, v. 22, p. 4385-4389,
24 2004.
25
- 26 TORRES, A. C.; CALDAS, L, S.; BUSO, J, A. Aplicações da cultura de tecidos no
27 melhoramento genético de plantas. **Cultura de Tecidos e transformação genética**
28 **de plantas**, 1998.
29
- 30 TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.;
31 NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANA, E. **Glossário de biotecnologia**
32 **vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.
33

- 1 TORRES, A.C.; DUSI, A. N.; SANTOS, M. do D. M. dos. **Transformação genética**
2 **de plantas via *agrobacterium*: teoria e prática**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças,
3 195 p., 2007.
4
- 5 TRAVELLA, S.; ROSS, S.; HARDEN, S. et al. A comparison of transgenic barley
6 lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated
7 techniques. **Plant Cell Report ? Genetic Transformation and Hybridization**, v.
8 23, p. 780–789, 2005.
9
- 10 TSAY, H. S.; GAU, T. G.; CHEN, C. C. Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by
11 tissue culture, **Plant Cell Reports**. v. 8, p. 450-454, 1989.
12
- 13 TSUCHIZAKI, N.; ISHIKAWA, J.; HOTTA, K. Colony PCR for rapid detection
14 of antibiotic resistance genes in MRSA and enterococci. **Journal of Antibiotics**, v.
15 53, p. 422-429, 2000.
16
- 17 TWYMAN, R. M.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R.
18 Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends**
19 **Biotechnology**, v. 21, p. 570-578, 2003.
20
- 21 TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of
22 plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17,
23 p.147–154, 2006.
24
- 25 VERWEIJ, W. R.; HAAN, L.; HOLTROP, M. Mucosal immunoadjuvant activity of
26 recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: Induction of
27 systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with
28 influenza virus surface antigen. **Vaccine**, v. 16, p. 3476-3482, 1998.
29
- 30 VIDAL, S. V. **Regeneração e Transformação Genéticas de Plantas**.
31 <http://www.repdigital.cnptia.embrapa.br/bitstream/CNPA/19611/1/CIRTEC64.pdf>,
32 acesso em 20 jan. 2010.
33
34

- 1 WALMSLEY, A. M.; ARNTZEN, C. J. Plants for delivery of edible vaccines. **Current**
2 **Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 126–129, 2000.
- 3
- 4 WALMSLEY, A. M.; ALVAREZ, M, L.; JIN, Y.; KIRK, D. D.; LEE, S. M.; PINKHASOV,
5 J. et al. Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a
6 fusion protein in transgenic tomato. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 1020–1026, 2003.
- 7
- 8 YOUNG, T. F.; THACKER, E. L.; ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F. A Tissue Culture
9 System to Study respiratory Ciliary Epithelial Adherence of Selected Swine
10 Mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 269, 2000.
- 11
- 12 YU, J.; LANGRIDGE, W. H. R. A plant-based multicomponent vaccine protects mice
13 from enteric disease. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 548-552, 2001.
- 14
- 15 ZERBINI, F. M.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, E. C. O silenciamento de RNA como
16 um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão Anual de Patologia de**
17 **Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 191-243, 2005.
- 18
- 19 ZHANG, Q. J.; YOUNG, T. F.; ROSS, R. F. Identification and characterization of a
20 *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1013-1019,
21 1995.
- 22
- 23 ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant
24 cell. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1041-1047, 1995.
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

8.0 APÉNDICE

8.1 Análise de regressão polinomial para sobrevivência de entrenós de tabaco, cv. 418, submetidos a diferentes concentrações de canamicina realizado pelo programa Winstat, versão 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

Causas da Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Regressão Linear	1	15413.33**
Regressão Quadrática	1	1866.66
Regressão Cúbica	1	270
Resíduo	8	-

** - Significativo ao nível de 1%, pelo Teste F

8.2 Análise da variância para sobrevivência de entrenós de tabaco, cv. 418, submetidos a diferentes concentrações de canamicina realizado pelo programa Winstat, versão 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

Causas da Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Dose	4	4393.33**
Repetição	2	46.66
Resíduo	8	138.33
Média Geral	-	38.66
Coeficiente de Variação	-	30.41

** - Significativo ao nível de 1%, pelo Teste F

8.3 Análise de regressão polinomial da percentagem para sobrevivência de folhas de tabaco, cv. 418, submetidas a diferentes concentrações de canamicina realizado pelo programa Winstat, versão 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

Causas da Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Regressão Linear	1	2.95**
Regressão Quadrática	1	2.11**
Regressão Cúbica	1	0.73**
Resíduo	8	-

** - Significativo ao nível de 1%, pelo Teste F

8.4 Análise da variância da percentagem para sobrevivência de folhas de tabaco, cv. 418, submetidas a diferentes concentrações de canamicina realizado pelo programa Winstat, versão 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

Causas da Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Dose	4	1.47**
Repetição	2	4.56**
Resíduo	8	2.22
Média Geral	-	0.41
Coeficiente de Variação	-	1.50

** - Significativo ao nível de 1%, pelo Teste F